



Fecha de presentación del Informe: Día  Mes  Año

**Datos generales del Proyecto**

Código del proyecto: 1754			
Título del proyecto: PERFILES DE METILACIÓN DE GENES LOCALIZADOS EN LA REGIÓN CRÍTICA DEL SÍNDROME DE DOWN EN EL DNA DE MADRES SANAS Y SUS HIJOS CON SÍNDROME DE DOWN DE LA CIUDAD DE CALI			
Facultad o Instituto Académico: Facultad de Salud			
Departamento o Escuela: Escuela de Ciencias Básicas			
Grupo (s) de investigación: Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-			
Investigadores <sup>1</sup>	Nombre	Tiempo asignado (h/s)	Tiempo dedicado
Investigador Principal	Jairo Alarcón	6/12 meses	6/24 meses
Coinvestigadores	José María Satizábal Soto	3/12 meses	3/24 meses
	Adalberto Sánchez Gómez	3/12 meses	3/24 meses
	Julio César Montoya Villegas	4/12 meses	3/24 meses
	Lina Johanna Moreno	15/12 meses	15/24 meses
Otros participantes	Dianora Fajardo Colorado	20/12 meses	30/24 meses
	Daniela Fernanda Ruiz	3/6 meses	3/6 meses
	María Alejandra Abonía Cabezas	3/6 meses	3/6 meses

<sup>1</sup> Todas las personas relacionadas en el informe y que participen en el proyecto deben haber suscrito el acta de propiedad intelectual de acuerdo con los formatos establecidos.

## **1. RESUMEN EJECUTIVO:**

La epigenética se refiere a la regulación heredable de la expresión génica sin cambio en la secuencia de nucleótidos. Muchas investigaciones han mostrado como las alteraciones epigenéticas pueden conducir a varias patologías, lo que ha incrementado los estudios sobre la influencia de los procesos de metilación en genes cruciales de muchas enfermedades. A pesar de ello, existe muy poco conocimiento acerca de perfiles de metilación de DNA en genes asociados con el Síndrome de Down (SD) y la manera cómo los factores epigenéticos pueden estar involucrados en su etiopatogenia. Por tal motivo, se analizaron los perfiles de metilación de las secuencias promotoras de 10 genes localizados en la región crítica del Síndrome de Down (DSCR). Para ello se obtuvieron muestras de sangre de madres sanas de diferentes edades (menores de 20 años, de 21 a 34 años y mayores de 35 años) y sus hijos con SD, más un grupo control de madres sanas en los mismos rangos de edad y sus hijos no afectados en el Valle del Cauca. Se extrajo el DNA de las muestras y se cuantifico el porcentaje de islas CpG metiladas de los promotores de los 10 genes DSCR. Los resultados obtenidos evidenciaron perfiles diferenciales de metilación en la mayoría de los promotores de los genes DSCR entre los pacientes con síndrome de Down y el grupo control. Igualmente, esas mismas regiones promotoras mostraron diferencias de metilación entre los tres grupos de madres analizadas frente a sus controles. Estos resultados proporcionan evidencia sobre cómo ciertos mecanismos epigenéticos podrían influir tanto en el riesgo de tener un hijo con SD como en la patogénesis del SD misma, además de proponer genes candidatos que podrían contribuir grandemente en el fenotipo neurocognitivo observado en los pacientes con síndrome de Down.

**Palabras clave:** epigenética; síndrome de Down, metilación de DNA; DSCR; PMRT2; HMNG1.

## **ABSTRACT**

Epigenetics refers to heritable regulation of gene expression without change in the nucleotide sequence. Many studies have shown how epigenetic alterations can lead to various diseases, which has increased studies on the influence of the processes of methylation in genes crucial for many diseases. However, there is very little knowledge about DNA methylation profiles in genes

associated with Down Syndrome (DS), and the epigenetic factors involved in its pathogenesis. Therefore, we analyzed the methylation profiles of the promoter sequences of 10 genes located in the Down Syndrome Critical Region (DSCR). For this purpose, we took blood samples of healthy mothers of different ages (under 20 years, 21 to 34 years and older than 35 years) and their children with DS, and a control group with healthy mothers of the same age range and their not affected children from Valle del Cauca. We extracted DNA from the samples and we quantified the percentage of methylated CpG islands of the 10 DSCR gene promoters. The results showed different methylation profiles in most of the promoters of the DSCR genes between patients with Down syndrome and the control group. Likewise, these same promoter regions showed differences in methylation between the three groups of mothers analyzed compared to their controls. These results provide evidence about how certain epigenetic mechanisms contribute the risk of having a child with SD and the pathogenesis of SD itself, in addition to proposing candidate genes that could greatly contribute to the neurocognitive phenotype observed in patients with Down syndrome.

**Keywords:** epigenetics; Down syndrome, DNA methylation; DSCR; PMRT2; HMNG1.

## **2. SÍNTESIS DEL PROYECTO:**

### **TEMA**

El síndrome de Down es un trastorno genético causado por la presencia total o parcial de una copia extra del cromosoma 21. Dentro de su sintomatología característica se encuentra el marcado déficit cognitivo, además de otras patologías y ciertos rasgos físicos que son propios de la enfermedad (Kazemi *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 1999). Debido a ello, muchos estudios han mostrado como una gran variedad de genes del cromosoma 21 posiblemente están implicados en las manifestaciones fenotípicas y patológicas (Antonarakis *et al.*, 2004). Sin embargo, los mecanismos que estarían relacionados con el riesgo de tener un hijo con SD aun no son completamente conocidos. Hasta el momento se ha aceptado que el factor de riesgo más determinante es la edad materna avanzada. No obstante, existen reportes de niños con síndrome de Down en madres jóvenes, que en muchas ocasiones no alcanzan la edad de 25

años (Coppedè, 2009; Abdel-Hady *et al.*, 2015). En consecuencia, las investigaciones más recientes postulan que ciertos procesos epigenéticos estarían jugando un papel trascendental en la etiopatogenia del SD, y probablemente de manera muy significativa en esas madres jóvenes (Coppedè, 2009; Božović *et al.*, 2015).

Estas observaciones se basan en el hecho de que la etapa del desarrollo temprano es altamente susceptible a eventos epigenéticos. Eso quiere decir que durante este periodo la tasa de síntesis de DNA es alta y los patrones de metilación son establecidos, al igual que los mecanismos de impronta genética, generando que el fenotipo responda a determinados estímulos internos y externos, tales como infecciones microbianas, factores demográficos, la dieta, el estrés, el consumo de alcohol, entre otros. En este contexto, el periodo gestacional se ve influenciado y determinado por el ambiente, el genotipo y la interacción que se produce entre ambos, generando así, que los patrones epigenéticos puedan ser alterados y que de esa manera se afecte la expresión de genes críticos asociados a procesos fisiológicos y patológicos (Morgan *et al.*, 2005; Alegría-Torres *et al.*, 2011).

Actualmente, muchas investigaciones han mostrado que una restricción proteica, de grasas o de vitaminas del grupo B, afecta la metilación del DNA y las histonas durante la etapa gestacional (Silva-Zolezzi *et al.*, 2017; Longo *et al.*, 2017; Furuse *et al.*, 2017; Won *et al.*, 2017). Se ha reportado que la deficiencia en folato da como resultado una metilación aberrante del DNA, además de mutaciones puntuales, rotura de cromosomas y aumento de la frecuencia de micronúcleos, recombinación cromosómica defectuosa y aneuploidía (James *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2012). Por su parte la deficiencia de vitamina B-12 puede inducir la hipometilación del promotor de algunos genes y reprimir su transcripción (Choi & Friso, 2010).

Diferentes estudios han mostrado que los reguladores epigenéticos también intervienen en procesos neuronales complejos tales como el aprendizaje y la memoria, lo que ha dado lugar a la hipótesis de que parte del fenotipo del síndrome de Down se programa de manera epigenética durante el primer trimestre del embarazo. Muchas investigaciones han postulado que la trisomía 21 ejerce sus efectos pleiotrópicos mediante la desregulación de un modificador epigenético, en donde tal modificador podría estar localizado en la región crítica del síndrome

de Down del cromosoma 21 (Coppedè, 2009). Sin embargo, en la actualidad es muy poco lo que se conoce con relación a los reguladores del epigenoma neuronal que nos puedan dar respuestas confiables sobre cuáles son las bases de la cognición (Korzus, 2010). Ante este panorama surgen preguntas de ¿Cómo estos reguladores intervienen en el mantenimiento de la homeostasis, influenciando la expresión de un grupo muy grande y heterogéneo de genes entre los que estarían los genes vitales (House-keeping) y otros no neuronales? o ¿Cómo un programa epigenético específico que regula genes neuronales están directamente involucrados en la determinación de la conectividad, aprendizaje y memoria? (Singh-Taylor *et al.*, 2017; Sanchez-Mut *et al.*, 2017). Por tal motivo, se necesitan más estudios que permitan correlacionar los cambios epigenéticos en la enfermedad y la salud, además de poder caracterizar esas marcas específicas del DNA en diferentes edades que puedan revelar la predisposición a ciertas patologías (Beyan *et al.*, 2012; El Hajj *et al.*, 2016; Coppedè, 2016; Mentis, 2016)

Adicionalmente, en estudios previos a nivel bioinformático se ha podido caracterizar el ambiente genómico de la Región Crítica del Síndrome de Down y comportamiento transcripcional de 38 genes localizados en la DSCR en varias estructuras de un cerebro humano normal (Montoya *et al.*, 2011). Con ello se ha observado que estos genes presentan una expresión diferencial a lo largo de áreas muy importantes del telencéfalo, las cuales están involucradas en el procesamiento de datos básicos referidos a la conducta, aprendizaje, memoria y control motor. Es importante resaltar que los genes analizados están implicados en procesos de diferenciación neuronal, desarrollo del sistema nervioso, regulación de procesos apoptóticos a nivel cerebral, entre otros. Sin embargo, aún falta profundizar más sobre cómo los factores epigenéticos tales como la metilación, pueden estar asociados en la etiopatogenia de este trastorno, especialmente en las madres jóvenes de niños con SD.

Con el fin de establecer si existen variaciones en los perfiles de metilación a nivel intra e inter grupal, en este trabajo se compararon los perfiles de metilación de 10 de los 38 genes DSCR en madres sin trisomía 21 de diferentes edades y sus hijos con síndrome de Down, con un grupo control compuesto por madres e hijos sin trisomía 21 en los mismos rangos de edad. Los resultados ayudaron a determinar cómo los procesos de metilación CpG influyen en esta patología, además poder identificar poblaciones en riesgo.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los perfiles de metilación de la región promotora de 10 genes localizados en la región crítica del síndrome de Down en madres sanas de diferentes edades y sus hijos con síndrome de Down en el Valle del Cauca.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Calcular el porcentaje de metilación de la región promotora de 10 genes DSCR en tres grupos de madres sin trisomía 21 y sus hijos con SD.
- ✓ Cuantificar si existen diferencias en los perfiles de metilación entre los grupos de casos y controles para las 10 secuencias promotoras de los genes DSCR.
- ✓ Analizar si hay una asociación en la variable edad materna y en las improntas epigenéticas entre los tres grupos de madres con sus hijos SD.
- ✓ Analizar si el control epigenético de estos genes está asociado a la etiopatogénesis del SD.
- ✓ Construir perfiles de transcripción de los genes DSCR en todas las estructuras del cerebro humano normal, para correlacionar los niveles de expresión génica con la localización cerebral y su implicación con el fenotipo neurocognitivo del SD.

## **METODOLOGÍA**

Este estudio incluyó dos componentes: uno bioinformático y otro experimental epigenético.

### **COMPONENTE BIOINFORMÁTICO**

Se realizó un pequeño análisis bioinformático en el que se hallaron los valores de transcripción de 9 de los 10 genes DSCR incluidos en este estudio en todas las diferentes estructuras del cerebro humano (ver anexo 1). Los niveles de expresión se extrajeron de la base de datos del cerebro humano del Instituto Allen para las Ciencias del Cerebro. Todos los procedimientos

utilizados para la obtención de los datos empleados en este estudio, se consignan de manera extensa en el informe técnico del “Allen Institute for Brain Sciences” (<http://help.brain-map.org/display/humanbrain/Documentation>).

### **Minería de datos**

De la base de datos de micromatrices de ADN del “Allen Brain Atlas” (<http://www.brain-map.org>) se extrajeron los valores de transcripción de los 9 genes DSCR a partir de cerebros post-mortem de individuos adultos sanos. Con ello se registraron los valores de expresión normalizados (z-score), y se consignaron en hojas electrónicas en formato Excel para su posterior análisis. Para cada estructura se tomaron los valores de todas las sondas disponibles y se consideró como dato final la mediana de esos valores.

### **Análisis de conglomerados**

A partir de las medianas obtenidas para cada una de las estructuras cerebrales se realizó un agrupamiento jerárquico con el software de uso libre Cytoscape, versión 3.2.0. La representación gráfica de los resultados fue a través de un mapa de calor (heat-map), por medio del plugin clusterMaker con una distancia métrica de correlación de Pearson.

## **COMPONENTE EXPERIMENTAL EPIGENÉTICO**

La parte experimental corresponde al estudio de los perfiles de metilación de la región promotora de los 10 genes DSCR.

### **Criterios de inclusión**

Para determinar los perfiles de metilación de la secuencia promotora de los 10 genes DSCR, se utilizaron los siguientes criterios de inclusión:

1. Madre sana con hijo afectado de síndrome de Down confirmado por cariotipo (trisomía

libre), los cuales sean residentes en Santiago de Cali de diferentes estratos socioeconómicos.

2. Madre sana con hijo no afectado de síndrome de Down, los cuales sean residentes en Santiago de Cali de diferentes estratos socioeconómicos.
3. Tanto los niños con síndrome de Down como los niños sanos deben estar en un rango de edad de mínimo 6 meses y máximo 3 años.

### **Diseño experimental**

Se realizó un control pareado para la variable “edad materna”, y se incluyeron en el estudio los siguientes grupos de muestras provenientes de leucocitos de sangre periférica de cada uno de los participantes:

- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas menores de 20 años y su hijo con SD.
- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas entre los 21-34 años y su hijo con SD.
- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas mayores de 35 años y su hijo con SD.

- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas menores de 20 años y su hijo sano.
- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas entre los 21-34 años y su hijo sano.
- 1 muestra de DNA de leucocitos de 2 madres sanas mayores de 35 años y su hijo sano.

### **Genes incluidos en el estudio**

Los 10 genes DSCR fueron seleccionados teniendo en cuenta los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación acerca de su expresión génica. Estos genes presentaron los niveles de transcripción (z-score) más altos en estructuras cerebrales estrechamente relacionadas con aprendizaje, memoria, atención y coordinación locomotora (Montoya et al., 2011) (ver anexo 2).



### **Obtención de la muestra y cuantificación de islas CpG**

Para el respectivo análisis se tomaron muestras de sangre periférica bajo consentimiento informado de cada uno de los participantes, y con el previo aval del comité de ética de la Universidad del Valle. Los leucocitos se separaron por Ficoll-Hypaque, e inmediatamente se extrajo el DNA utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue de Qiagen, para este paso se siguió el protocolo recomendado por la casa fabricante. Después de esto, se calculó la concentración de DNA en cada una de las muestras con el equipo Thermo Scientific NanoDrop 2000, y se realizó una PCR convencional de beta-globina para evaluar que la muestra amplificara correctamente, esos resultados se verificaron por medio de una electroforesis en el gel de agarosa al 1%.

Después de evaluar que las muestras amplificaran se realizó la cuantificación de las islas CpG de cada uno de los promotores de los 10 genes, para ello se diseñaron 24 placas de 96 pozos por medio del kit “EpiTect Methyl II Custom PCR Arrays” de Qiagen. Es importante mencionar que cada placa tenía la capacidad de cuantificar la metilación de la región promotora de los 10 genes DSCR en 2 muestras, y contenían además 2 controles llamados SEC y DEC que sirven para verificar la confiabilidad del ensayo. De esta manera, se sacaron cuatro alícuotas de cada muestra de ADN y se sometieron a diferentes tratamientos de degradación enzimática, para ello se utilizaron las enzimas de restricción MSRE (sensible a la metilación) y MDRE (dependiente de metilación). Posteriormente se depositaron 25 µl de cada uno de los 4 tratamientos (Mo, MS, Md y Msd) en los respectivos pozos tal como lo establece el protocolo de la casa fabricante (Figura 1).

Figura 1. Diseño de la placa de PCR-RT. Cada placa contenía 96 pozos con las sondas de las secuencias promotoras de cada gen. Mo: pozos para muestras sin enzimas de restricción, la muestra presenta la cantidad total de ADN genómico para la detección en PCR-RT (tratamiento 1). Ms: pozos para muestras tratadas con enzimas de restricción MSRE las cuales son sensibles a la metilación. No son capaces de romper citosinas metiladas, dejando intacto al ADN metilado (tratamiento 2). Md: pozos para muestras tratadas con enzimas de restricción MDRE las cuales son dependientes de metilación. Rompen secuencias de ADN metilado (tratamiento 3). Msd: pozos para muestras tratadas con ambas enzimas (MSRE y MDRE) por lo

cual se digiere todo el ADN (tanto metilado como no metilado). Esta reacción mide el fondo y la cantidad de ADN que se colocó inicialmente y que se resiste a ser degradado, o sea, refractario (tratamiento 4).

Array Layout Table with Gene Symbol and Position Information for one sample, 12-gene array/ 96-well plate.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mo	A	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
	B	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
Ms	C	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
	D	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
Md	E	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
	F	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
Msd	G	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC
	H	BACE2	CSTB	RCAN1	PIGP	PRMT2	DSCAM	BRWD1	HMG1	SIM2	DSCR3	SEC	DEC

Muestra 1
Muestra 2

Para cuantificar el porcentaje de citosinas metiladas en cada muestra se utilizó el equipo de PCR en tiempo real CFX96 Real-time system/c-1000 Touch thermal cycler (Bio Rad), y finalmente se extrajeron y se analizaron los resultados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Dentro de los datos extraídos del equipo de PCR el gen BRWD1 presentó errores en algunas placas (la sonda no era leída por el equipo y marcaba como “error”), debido a ello se decidió no tener en cuenta sus resultados en ningún participante.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

### Análisis descriptivo de los datos

Como primer paso, se realizó un análisis descriptivo de los porcentajes de metilación mediante la determinación de los valores mínimos y máximos presentados para los casos y controles, fijando el gen, el tipo de madre e hijo y teniendo en cuenta todos los grupos de edad de las

madres. Debido al número reducido de datos no es recomendable la comparación de los rangos por edades con tan solo dos valores, es por esto que se evaluaron los valores mínimos y máximos tomando para cada gen y tipo de madre o hijo, los datos de los tres grupos de edad. Además de ello, se decidió utilizar estadística bayesiana y el Teorema de Bayes para la estimación de la media, mediana, DIC y regiones de HPD del 95% para los porcentajes de metilación de los diferentes grupos de estudio.

### **Identificación de la distribución de probabilidad para la verosimilitud de los datos**

Se asoció para la función de verosimilitud de los porcentajes de metilación, una distribución uniforme en el intervalo  $(0, \theta)$  donde  $\theta$  corresponde al valor posible del porcentaje y está definido entre 0 y 100. Se escogió esta distribución suponiendo para cada valor del porcentaje de metilación igual probabilidad de ocurrencia.

### **Identificación y elicitación de la distribución a priori**

Para la distribución a priori de las madres y de los hijos, se utilizó como distribución conjugada de la uniforme, la distribución Pareto, donde el parámetro de forma se interpreta como la medida de amplitud de la distribución de los porcentajes de metilación y el parámetro de escala como el porcentaje mínimo de los datos de metilación.

Con respecto al proceso de elicitación de los dos hiperparámetros de la distribución a priori, se igualó la expresión de la media muestral y la poblacional de la variable, obteniendo una expresión que permitió hallar el valor del parámetro de forma, para lo cual se requirió el uso de valores mínimos y máximos de los datos de información a priori, generando así cuatro escenarios:

- Valor mínimo y máximo de los controles,
- Valor mínimo y máximo de los casos,
- Valor mínimo y máximo de los casos y los controles,
- Promedio de los valores mínimos y promedio de los valores máximos de casos y controles.

De acuerdo a la información brindada por cada uno de los escenarios, se elicó el valor del parámetro de forma y el parámetro de escala, el cual corresponde al valor mínimo de los datos.

Para cada uno de los cuatro escenarios y cada grupo de estudio, se halló el valor de los parámetros de la distribución a posteriori (distribución Pareto) y se procedió a ajustar los modelos para la estimación puntual y por intervalo. El proceso de simulación de los datos de la distribución a posteriori se realizó mediante el programa estadístico R, donde se generaron 10000 números aleatorios de la distribución Pareto para cada modelo y se realizó la estimación de la media, mediana, DIC y regiones de credibilidad del 95%.

### **Selección de los mejores modelos para cada grupo de estudio**

Dado al gran número de modelos ajustados entre los cuatro escenarios, se utilizó el DIC como metodología para seleccionar el mejor modelo entre los diferentes escenarios para cada gen, para cada tipo de madre y de hijo y para cada grupo de edad de la madre.

### **Prueba de hipótesis entre los grupos de estudio**

Después de escogido los mejores modelos, se realizó la comparación de los porcentajes de metilación para los casos y controles de las madres e hijos (entre los grupos de edad y para cada gen) de manera gráfica, representando las regiones del 95%. En aquellas situaciones en las que no se evidenció gran diferencia entre los porcentajes de metilación bien sea de las madres o los hijos, se formaron agrupaciones con las regiones HPD traslapadas o cruzadas entre ellas y se probó las hipótesis sobre las diferencias entre porcentajes con el Factor de Bayes.

Para el cálculo de las probabilidades predictivas utilizadas para el proceso de Bayes, se hizo un acercamiento para cada agrupación mediante la distribución uniforme. La distribución para los porcentajes se tomó en un intervalo de 0 a  $\hat{\theta}$ , donde  $\hat{\theta}$  representa la media a posteriori de la distribución Pareto y se calculó la probabilidad de que el valor mínimo de los porcentajes

mínimos, bien sea de las madres o de los hijos pertenecientes a la agrupación, estuviera entre ese valor y la media a posteriori menor del grupo. Posteriormente, se procedió a calcular el valor del Factor de Bayes y concluir con base en los resultados obtenidos.

### **Elicitación de los hiperparámetros de la distribución a priori y cálculo de los parámetros de la distribución a posteriori**

Para la elicitación de los hiperparámetros, se igualó la expresión de la media muestral con la poblacional de la distribución Pareto,

$$\frac{\theta_1 + \theta_2}{2} = \frac{\alpha \beta^\alpha}{\alpha - 1}$$

Donde  $\theta_1$  y  $\theta_2$  corresponden respectivamente al valor mínimo y máximo de los porcentajes de metilación. Como el parámetro  $\beta$  hace referencia al valor mínimo entre los porcentajes, se puede definir como  $\theta_1$ . Después de despejar  $\alpha$ , la expresión resultante para hallar el valor del parámetro de forma y con la cual se elicitaron los parámetros de la distribución a priori para los cuatro escenarios y para cada grupo de estudio fue:

$$\alpha = \frac{1}{1 - \frac{2\theta_1}{\theta_1 + \theta_2}}$$

Se hallaron los valores de los parámetros de la distribución a priori y con ellos se determinaron los valores de los parámetros de la distribución a posteriori, la cual por medio del Teorema de Bayes, resulta una distribución Pareto con parámetros  $\alpha^* = \alpha + 2$  y  $\beta^* = \max(\beta, x_1, x_2)$ , donde  $\alpha$  y  $\beta$  corresponden a los parámetros de la distribución a priori y,  $x_1$  y  $x_2$  son los porcentajes de metilación resultante del experimento para el grupo de estudio analizado.

### **Selección de los mejores modelos para cada grupo de estudio:**

Se seleccionó entre los cuatro escenarios planteados mediante el DIC, las distribuciones a posteriori que presentaron un mejor ajuste para cada grupo de estudio. En esta selección, las distribuciones que mejor se ajustaban para los tres grupos de edad, era las del escenario 3 que corresponde al valor mínimo del porcentaje de metilación entre los casos y controles y el valor

máximo de los porcentajes entre los casos y controles. Entre los tres grupos tan solo se eligió una distribución a posteriori del escenario 4.

### **Prueba de hipótesis entre los grupos de estudio**

Para la comparación de los porcentajes de metilación por gen, para edad de la madre y para los casos y controles de madres e hijos, se halló la media, mediana y las regiones HPD del 95%. En este proceso no se utilizó la media ya que debido a la asimetría de los datos, la media presenta ciertos problemas de apalancamiento por valores muy altos, lo que hace a la mediana un mejor indicador.

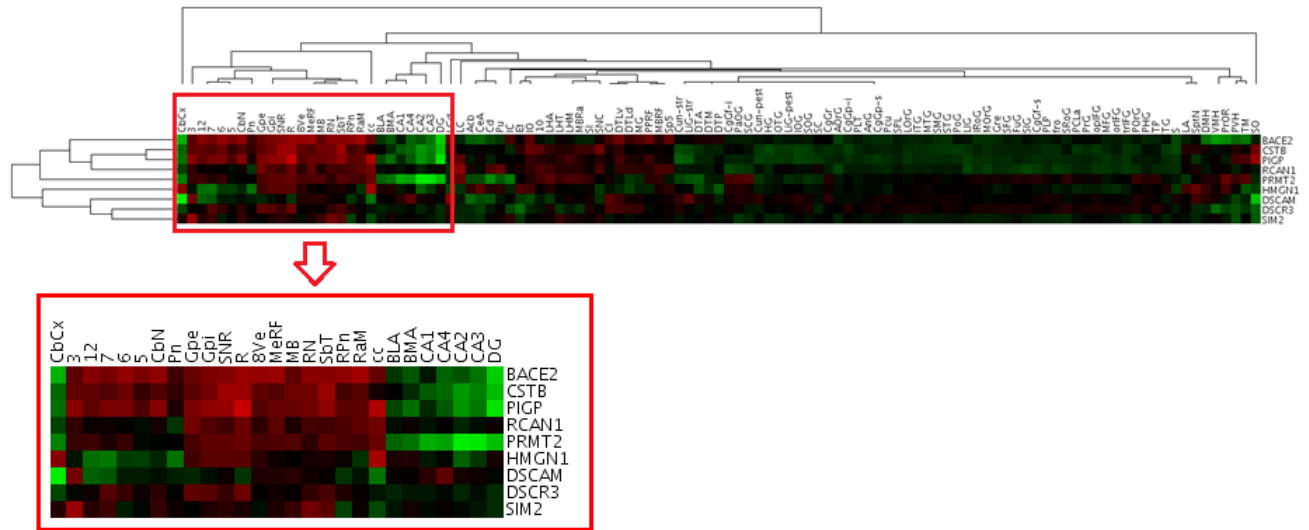
## **RESULTADOS OBTENIDOS**

### **COMPONENTE BIOINFORMÁTICO**

#### **Análisis de conglomerados**

Se obtuvo el valor de la expresión génica de cada uno de los 9 genes DSCR en todas las estructuras cerebrales. De estos resultados se puede observar una expresión diferencial y específica a lo largo de las diferentes zonas cerebrales, sugiriendo así, una fina regulación génica la cual es dependiente de la fisiología de cada estructura (figura 2).

Figura 2. Análisis de conglomerados de la expresión de los 9 genes DSCR a lo largo de las distintas estructuras del cerebro humano. Las regiones con mayor expresión se encuentran en una escala de 0.1 a 3.0 (rojo), mientras que las zonas donde hay baja expresión tienen una escala de -0.1 a -3.0 (verde).



En la figura 2 se puede observar que las regiones de mayor expresión son estructuras relacionadas con funciones motoras, tales como los núcleos cerebrales en donde hay una notable sobre-expresión en el globo pálido tanto interno como externo. Del mismo modo la mayoría de las estructuras del diencefalo (entre las que se encuentran varias subestructuras del epitalamio, el hipotálamo y el tálamo) se encuentran sobre-expresadas, al igual que en el tegmento mesencefálico, tegmento pontino, mielencefalo y cuerpo calloso (ver anexo 2).

## COMPONENTE EXPERIMENTAL EPIGENÉTICO

### Análisis descriptivo de los datos

Al realizar el análisis descriptivo de los porcentajes de metilación se obtuvieron los valores mínimos y máximos para las madres pertenecientes a los controles (MS) y para las madres SD (MSD) (Tabla 1).

Tabla 1. Valores mínimos y máximos de los porcentajes de metilación por gen y tipo de madre.

Gen	MS		MSD	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
BACE2	0,03%	1,81%	0,05%	0,14%
CSTB	0,03%	5,16%	0,07%	1,97%
RCAN1	0,00%	5,99%	0,02%	50,62%
PIGP	0,00%	1,18%	0,06%	0,19%
PRMT2	0,00%	3,94%	0,06%	0,73%
DSCAM	0,19%	56,55%	0,04%	51,00%
HMG1	0,01%	99,99%	0,06%	0,85%
SIM2	0,04%	1,86%	0,03%	0,36%
DSCR3	0,00%	0,91%	0,03%	0,14%

De la Tabla 1 se puede observar que en los genes BACE2, CSTB, RCAN1, PIGP, PRMT2, HMG1 y SIM2, se presentan diferencias importantes entre los rangos de los porcentajes de metilación entre las madres casos y controles. Las madres controles presentan, dentro de los porcentajes de metilación máximos, valores más altos en la mayoría de genes comparado con las madres del grupo control; pero en los valores mínimos, presentan los valores más bajos. Con lo anterior es posible decir que el rango de los porcentajes de metilación para las madres controles resulta más amplio que para las madres SD. Sin embargo, este tipo de comportamiento no es muy claro para los hijos sanos (HS) e hijos con SD (HSD) (Tabla 2).

Tabla 2. Valores mínimos y máximos de los porcentajes de metilación por gen y tipo de hijo.

Gen	HS		HSD	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
BACE2	0,09%	0,38%	0,03%	0,45%
CSTB	0,15%	100,00%	0,01%	0,78%
RCAN1	0,00%	1,49%	0,00%	1,02%
PIGP	0,03%	0,23%	0,00%	0,24%
PRMT2	0,00%	1,16%	0,04%	0,53%



DSCAM	0,05%	0,33%	0,00%	0,55%
HMG1	0,05%	0,31%	0,00%	0,48%
SIM2	0,00%	100,00%	0,00%	0,11%
DSCR3	0,02%	0,24%	0,00%	0,29%

En la Tabla 2 no se encuentra a primera vista una relación directa entre los valores de los porcentajes de metilación de las madres con la de sus hijos, ni tampoco se observa una predominancia en los valores por parte de alguno de los dos tipos de hijos. Por su parte, entre los genes BACE2, PIGP, DSCAM, HMG1 y DSCR3, el que presenta mayor rango de porcentaje de metilación son los HSD.

Mediante el análisis descriptivo de los datos no es posible determinar a ciencia cierta las posibles relaciones entre los porcentajes de metilación de las madres por edad y sus hijos para los 9 genes, ni tampoco el efecto que produce la edad, por lo cual esto se realizó por medio de las medidas estadísticas de la distribución a posteriori.

### **COMPARACIÓN DE LAS MEDIANAS DE LOS PORCENTAJES DE METILACIÓN ENTRE LOS PACIENTES CON SD Y EL GRUPO CONTROL.**

Se obtuvo la mediana del porcentaje de metilación de cada una de las 9 regiones promotoras tanto en los pacientes SD como en los controles. Los resultados obtenidos permitieron observar perfiles diferenciales de metilación entre los pacientes con síndrome de Down y los controles en los tres grupos analizados.

La mayoría de los genes de los pacientes con síndrome de Down procedentes de madres menores a 20 años se encuentran hipometilados, excepto por el gen DSCAM (figura 9). Las diferencias más notorias se encuentran en los genes RCAN1, PRMT2 y CSTB (figuras 4, 6 y 8).

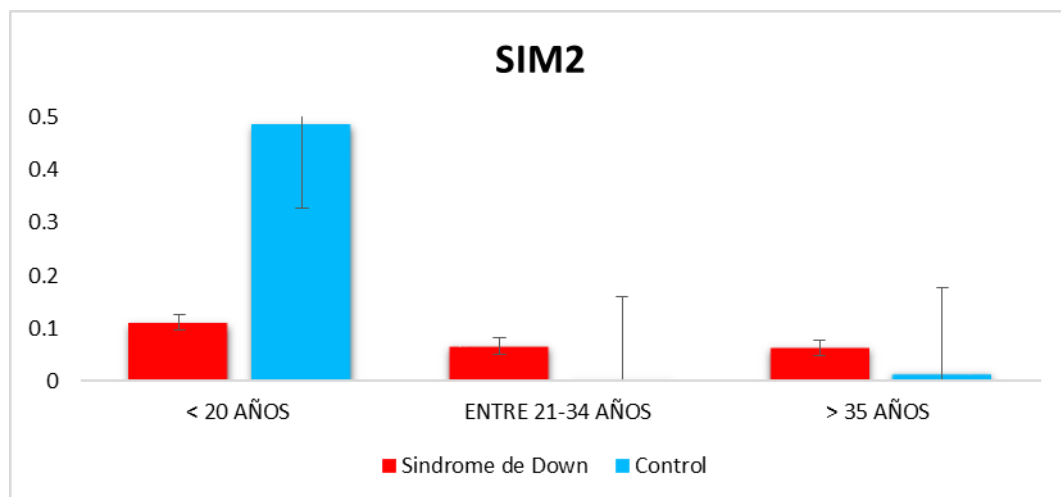
Con respecto a los pacientes con síndrome de Down de madres entre los 21 y 34 años de edad, se puede decir que aunque la mayoría de los genes exhiben perfiles diferenciales de metilación no es posible afirmar una tendencia de éstos, sin embargo cuatro de las regiones promotoras se encuentran notoriamente hipermetiladas (PMRT2, CSTB, DSCAM y SIM2), tres están

hipometiladas (BACE2, RCAN1 y DSCR3) y en dos de las regiones promotoras no es posible decir que hubo un diferencial en el porcentaje de metilación (HMGN1 y PIGP).

Al comparar las medianas entre los pacientes con síndrome de Down de madres mayores a 35 años y su grupo control. La mayoría de los genes se encuentran hipermetilados en los pacientes con síndrome de Down (excepto el gen DSCAM). Las diferencias más notorias radican en los genes PRMT2, DSCR3, BACE2, HMGN1 y PIGP (figuras 6, 10, 12, 14 y 16).

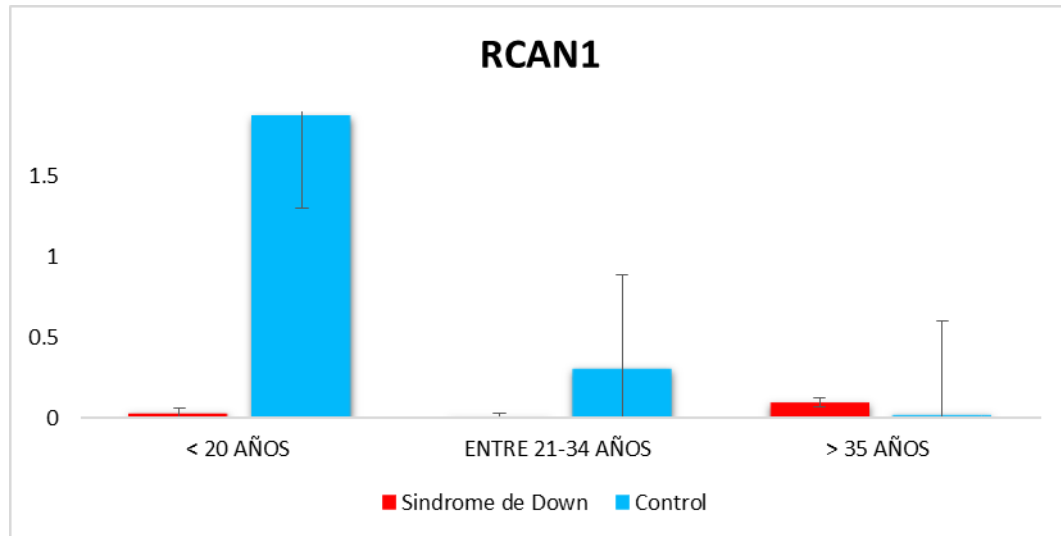
### Gen SIM2

Figura 3. Medianas de los porcentajes de metilación del gen SIM2 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



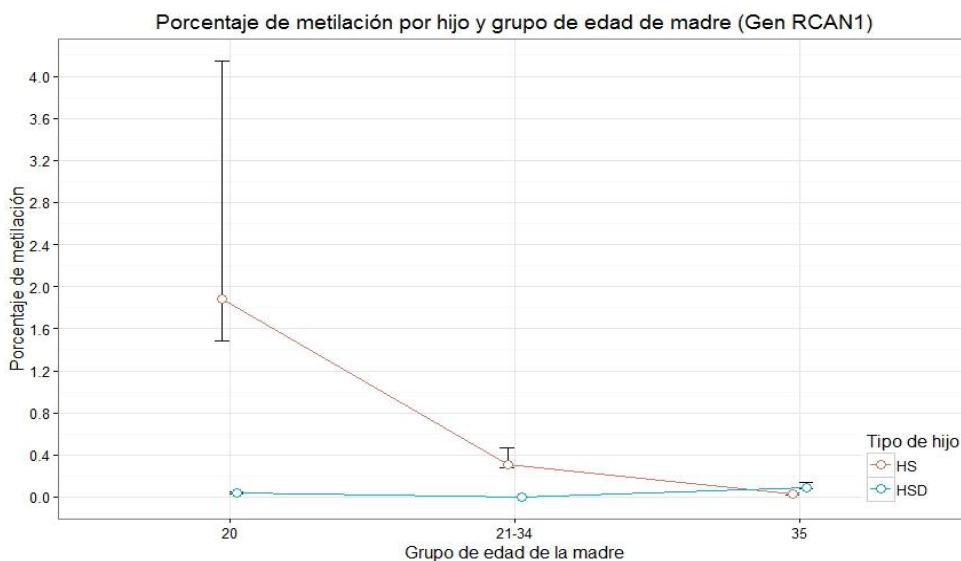
### Gen RCAN1

Figura 4. Medianas de los porcentajes de metilación del gen RCAN1 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



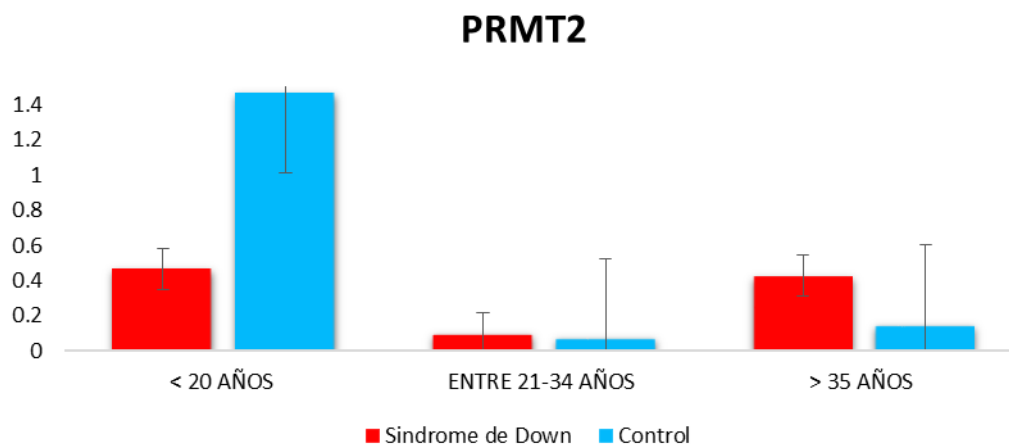
Se puede notar en la Figura 5 que para los HS se presenta un decrecimiento en los porcentajes de metilación a medida que aumenta la edad de la madre. Los porcentajes de este tipo de hijos para los dos primeros grupos de edad resultan mayores que los de HSD con medianas iguales a 1,881473% y 0,313341%, respectivamente; y 0,02725% para el tercer grupo.

Figura 5. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen RCAN1 y por hijo.



### Gen PRMT2

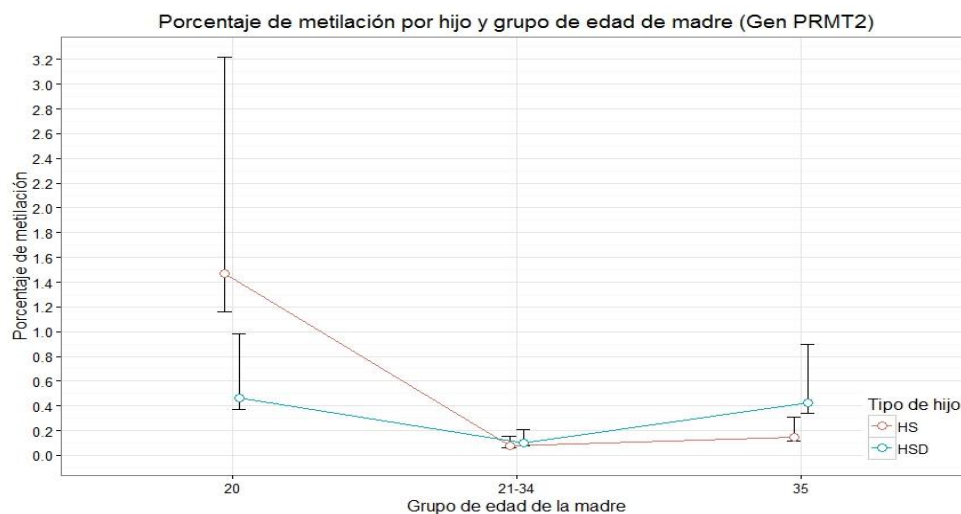
Figura 6. Medianas de los porcentajes de metilación del gen PRMT2 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



El comportamiento de los porcentajes de metilación para los hijos del primer grupo de edad, resulta mayor en los HS con una mediana de 1,466255% que en los HSD los cuales tienen una

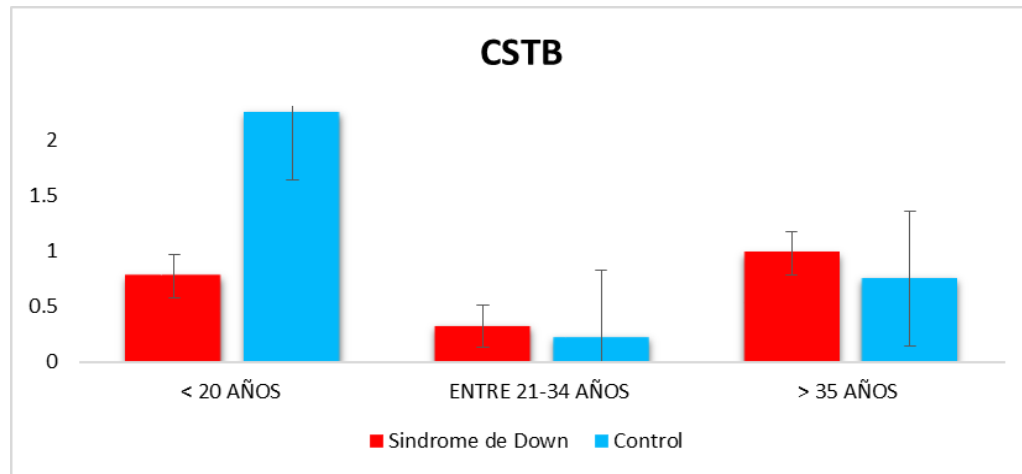
mediana de 0,465753% (Figura 7). Esta superioridad no se observa para el tercer grupo, donde los HSD presentan mayores datos y una mediana de 0,427299% en comparación con los HS que tienen una mediana de 0,02725%. En el grupo de edad de madres entre 21 a 34 años, los valores de las regiones HPD para ambos tipos de hijos se cruzan, para los HS la mediana es de 0,073752% y para los HSD 0,100974%.

Figura 7. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen PRMT2 y por hijo.



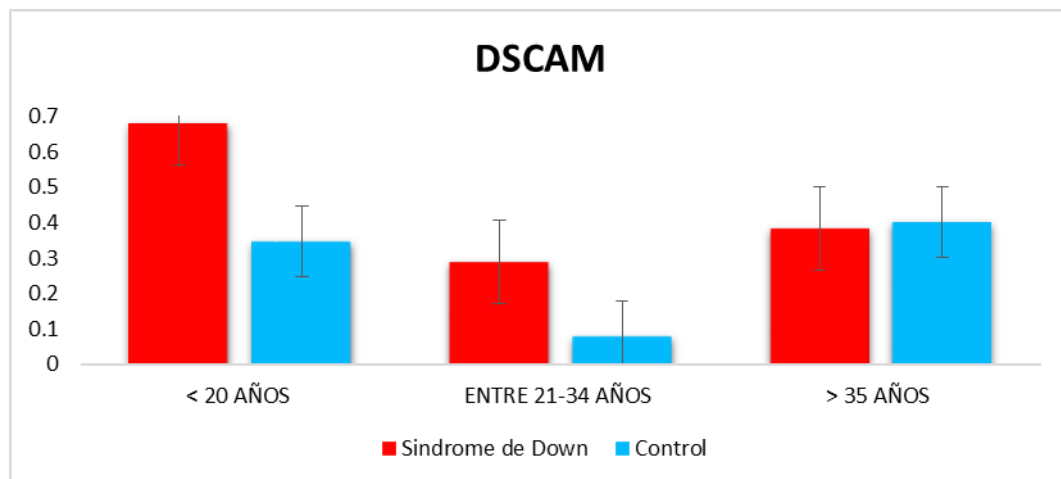
### Gen CSTB

Figura 8. Medianas de los porcentajes de metilación del gen CSTB en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



### Gen DSCAM

Figura 9. Medianas de los porcentajes de metilación del gen DSCAM en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



### Gen DSCR3

Figura 10. Medianas de los porcentajes de metilación del gen DSCR3 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.

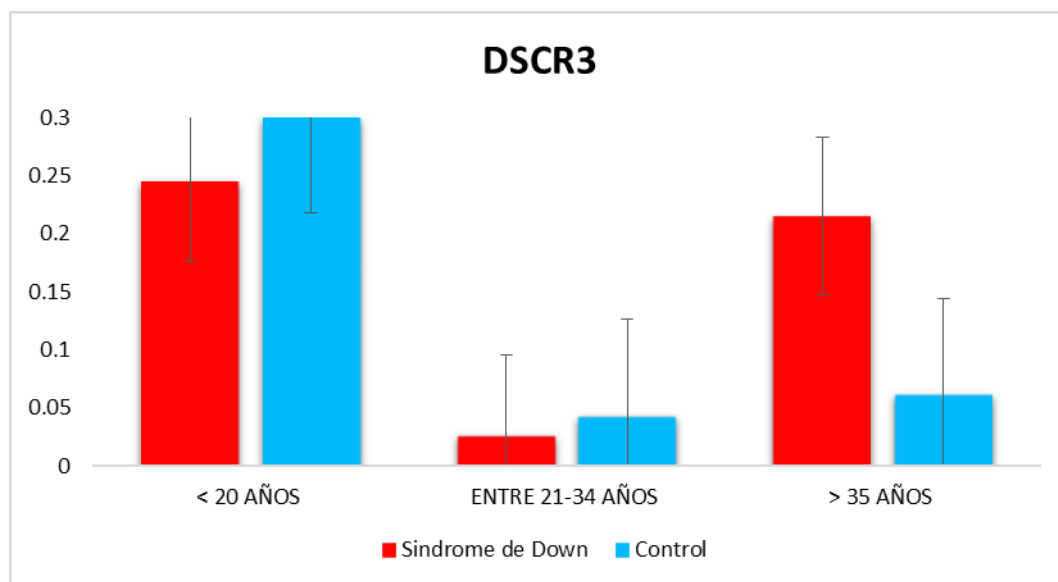
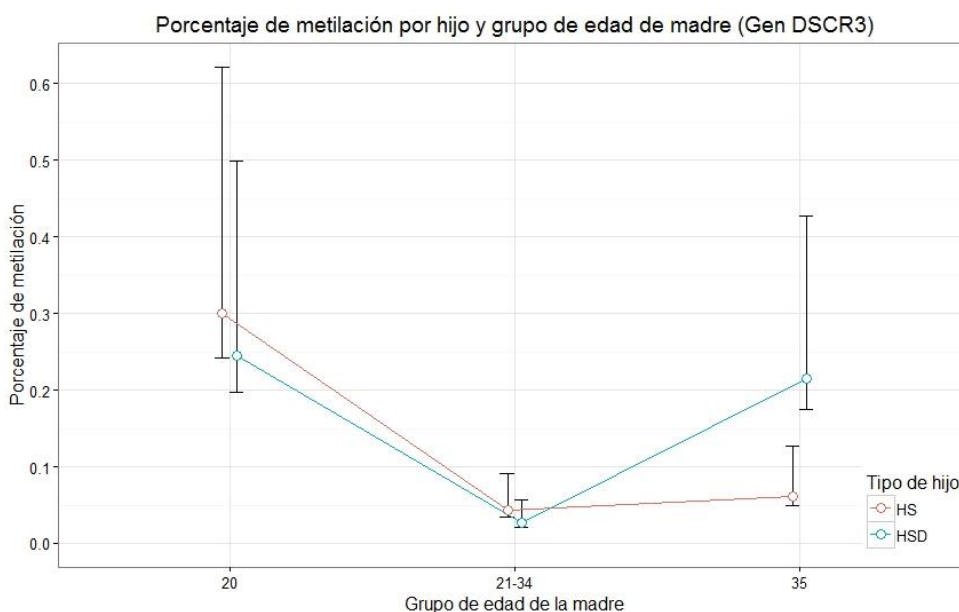


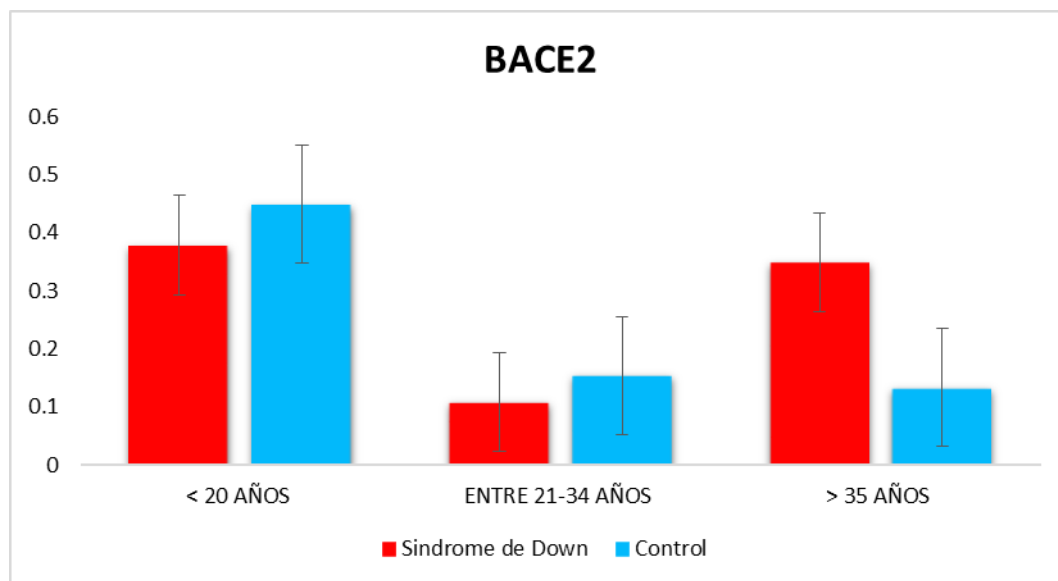
Figura 11. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen DSCR3 y por hijo.



Para los dos tipos de hijos el comportamiento de los porcentajes de metilación para las dos grupos de edad de las madres resultan muy similares, en el primero las medianas para los HS y los HSD son 0,300749% y 0,244997%, respectivamente; mientras que para el segundo grupo de edad la mediana para los HS es de 0,043478% y para los HSD es de 0,026762%. En los dos primeros grupos el valor de la mediana de los HS resultan mayores, lo que no ocurre en el tercer grupo, donde la mediana de los HSD es mayor (0,215282%) que la de los HS (0,061799%).

### Gen BACE2

Figura 12. Medianas de los porcentajes de metilación del gen BACE2 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.

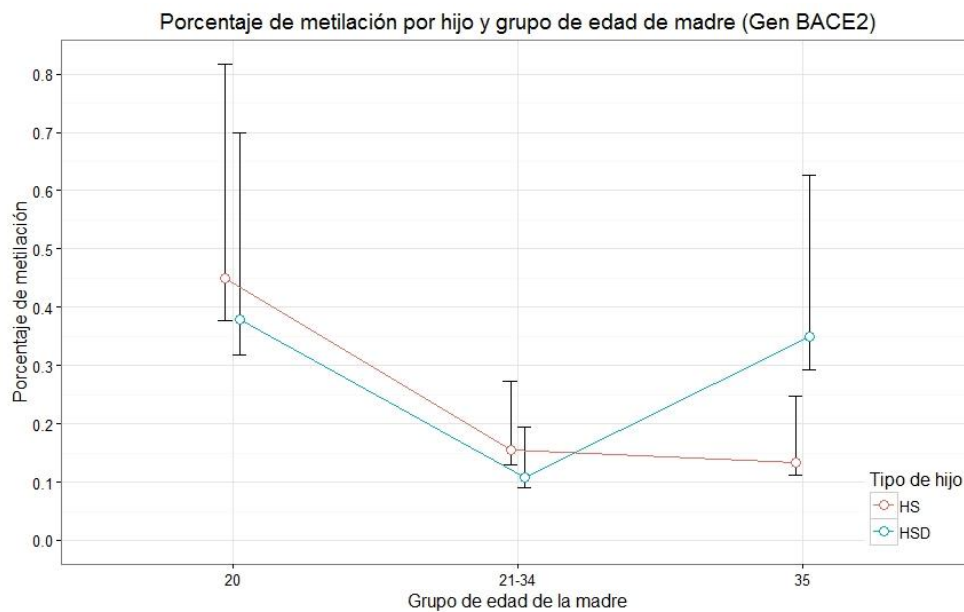


Analizando los porcentajes de metilación del gen BACE2 para los hijos (Figura 13), tenemos que para los hijos los cuales las madres se encuentran en un grupo de edad de menores de 20 años y entre 21 y 34, los porcentajes son muy similares, se presentan medianas de 0,449199% (HS) - 0,378634% (HSD) y 0,154205% (HS)- 0,10807% (HSD), para los grupos respectivos; situación que no ocurre con el grupo de edad de mayores o iguales a 35 años, donde el porcentaje de metilación para los HSD resulta ser más alto, con una mediana de 0,349028% y para los HS 0.13345%. Para los hijos observamos dos agrupaciones en la que los valores son similares: la primera corresponde a las regiones HPD de los HS y HSD del primer grupo de



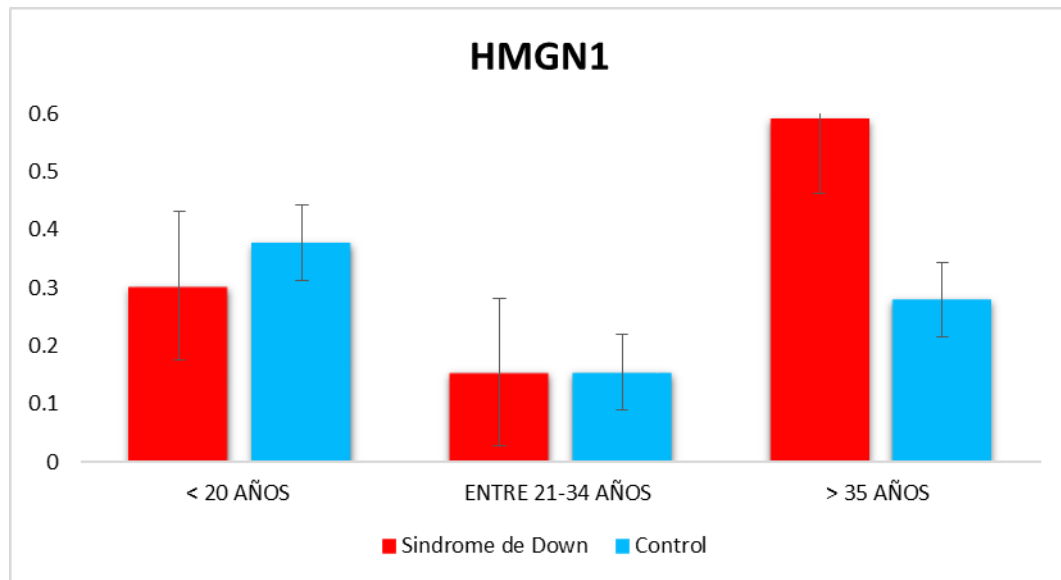
edad y los HSD del último grupo de edad, y la segunda agrupación compuesta por las regiones HPD de los HS y HSD del segundo grupo de edad y los HS del último grupo de edad. Realizando la comparación por medio del Factor de Bayes encontramos que los dos grupos presentan escasas diferencias entre los porcentajes de metilación ( $FB=1,55928626$ )

Figura 13. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen BACE2 y por hijo.



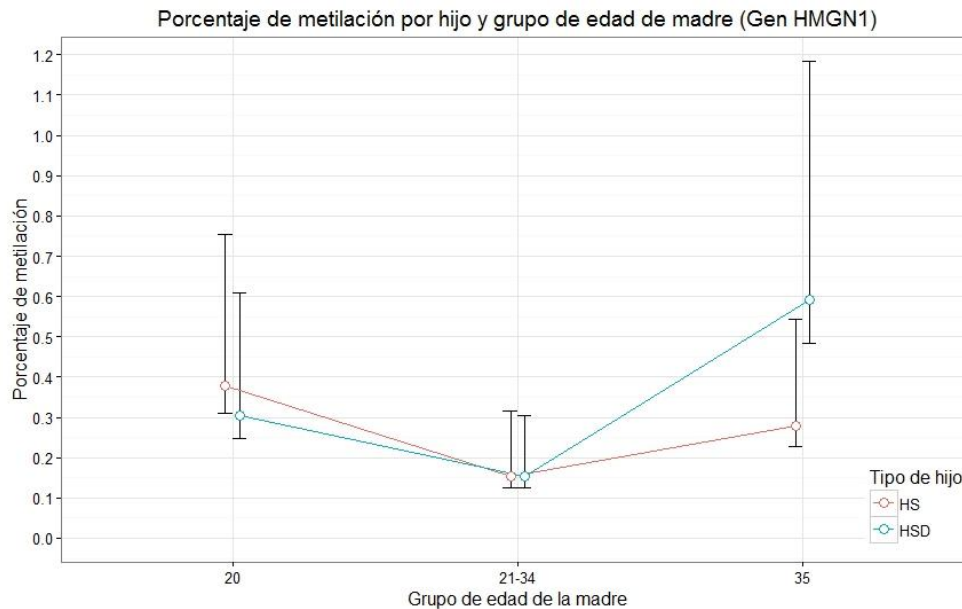
### Gen HMGN1

Figura 14. Medianas de los porcentajes de metilación del gen HMGN1 en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



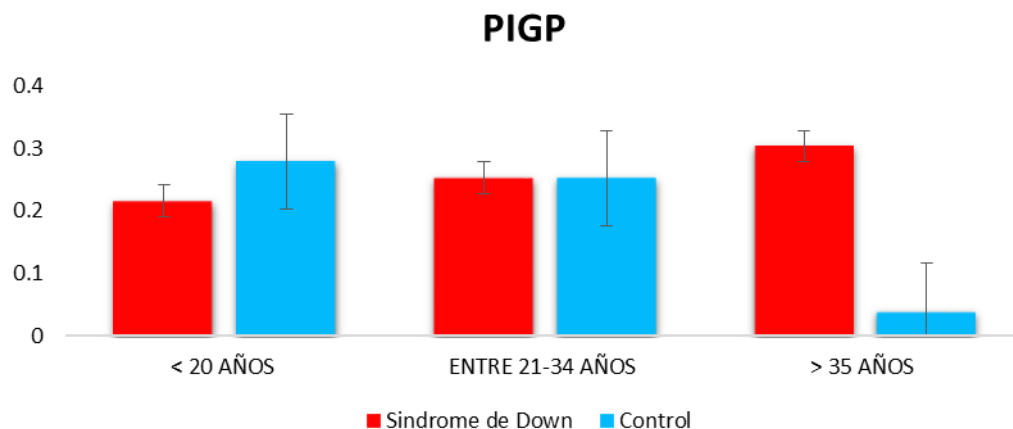
Comparando el comportamiento de los porcentajes de metilación de los hijos por grupo de edad de las madres, se observa que ambos tipos de hijos presentan un comportamiento y valores parecidos para el grupo de edad de menores a 20 años y para el de 21 a 34 años, con medianas de 0,378001% (HS) - 0,303719% (HSD) y 0,154416% (HS) - 0,154692 (HSD) respectivamente. Para el grupo de mayores a 35 años se observa un porcentaje mayor para los HSD con una mediana de 0,590941% comparada con la de los HS la cual es 0,279778%. Se observan comportamientos inversos para los dos tipos de hijos entre los dos primeros grupos de edad y los dos últimos grupos de edad.

Figura 15. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen HMGN1 y por hijo.



### Gen PIGP

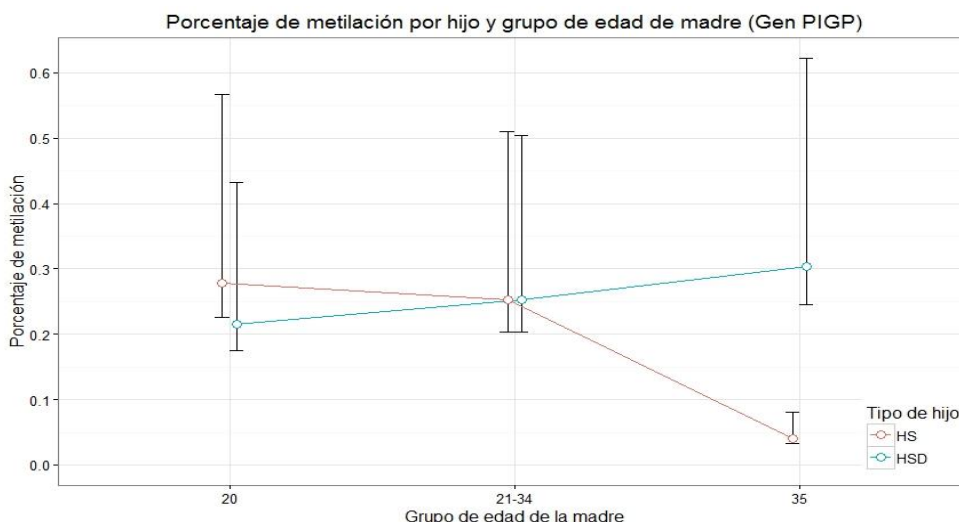
Figura 16. Medianas de los porcentajes de metilación del gen PIGP en pacientes con síndrome de Down y el grupo control.



Para los hijos se puede ver en la Figura 17 que los rangos de los porcentajes de metilación tienen valores similares, excepto para los HS de madres mayores a 35 años. Para los hijos de

madres menores a 20 años la mediana de los HS es de 0,27876% y la de los HSD de 0,21546%, para el grupo de madres entre 21 y 34 años la mediana para los HS es de 0,252533% y para los HSD es de 0,253152%, y para el grupo final la mediana de los HS es de 0,040539% y la de los HSD es de 0,303402%. Los valores de los HS de madres mayores a 35 años son diferentes de las demás regiones (FB=2,4258546).

Figura 17. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen PIGP y por hijo.



### COMPARACIÓN DE LAS MEDIANAS DE LOS PORCENTAJES DE METILACIÓN ENTRE MADRES SANAS DE PACIENTES CON SD Y EL GRUPO CONTROL.

Se obtuvieron las medianas de los porcentajes de metilación de cada región promotora para las madres sanas de pacientes con síndrome de Down y los controles. Los resultados evidenciaron perfiles diferenciales de metilación entre madres de pacientes con SD y el grupo control en los tres grupos analizados.

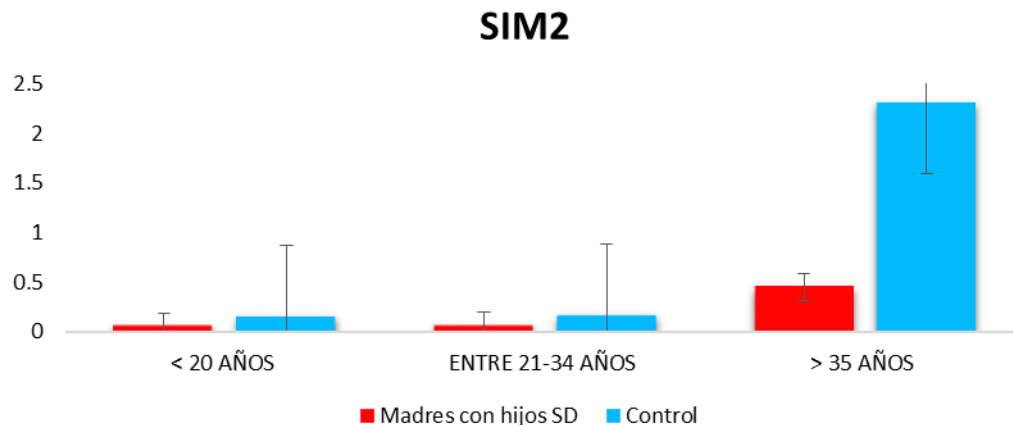
En el caso particular de las madres menores a 20 años de niños con síndrome de Down, los genes se encuentran hipermetilados. Las diferencias más notorias radican en los genes CSTB y HMGN1 (figuras 25 y 30). Mientras que En el caso de las madres mayores a 35 años de niños con síndrome de Down todos los genes se encuentran hipometilados, especialmente en los

genes PRMT2, RCAN1 y CSTB (figuras 19, 21 y 25). Sin embargo, la diferencia más significativa radica en el gen DSCAM el cual superó el 50% de hipermetilación en los controles (figura 28-B).

En las madres que se encuentran entre los 21 y 34 años de edad, la mayoría de los genes exhiben perfiles diferenciales de metilación pero no es posible afirmar una tendencia de éstos. No obstante, hay que recalcar que las regiones promotoras de los genes PMRT2, RCAN1, DSCR3, DSCAM y HMGN1 se encuentran hipermetiladas, mientras que los genes SIM2, BACE2, CSTB y PIGP se encuentran hipometilados.

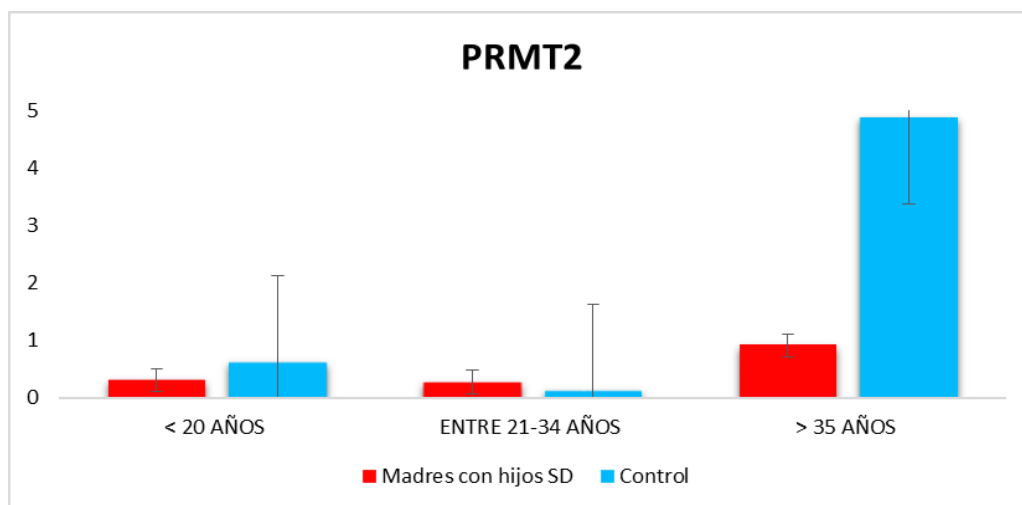
### Gen SIM2

Figura 18. Medianas de los porcentajes de metilación del gen SIM2 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



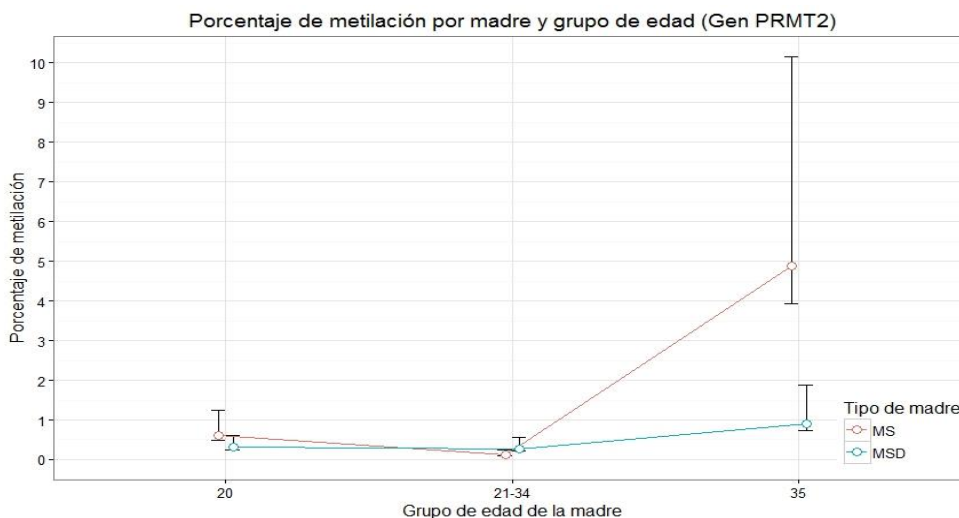
## Gen PRMT2

Figura 19. Medianas de los porcentajes de metilación del gen PRMT2 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



Para este gen, las MS del último grupo de edad presentan porcentajes de metilación más altos que el de todas las demás madres (Figura 20), con una mediana de 4,880406%. Para este mismo grupo de edad la mediana de las MSD es de 0,909864%.

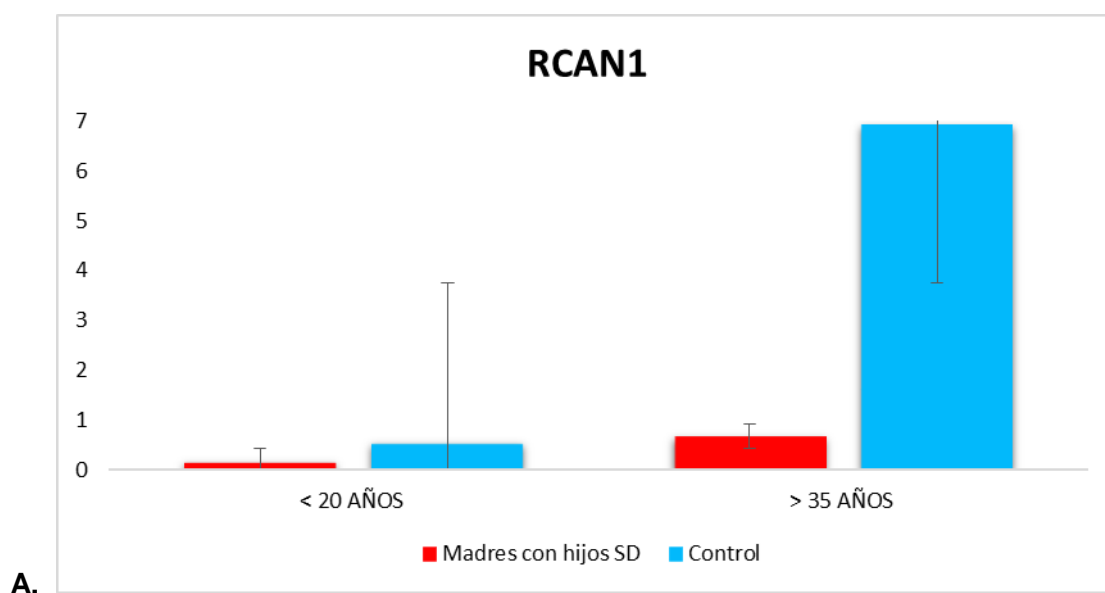
Figura 20. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen PRMT2 y por madre.

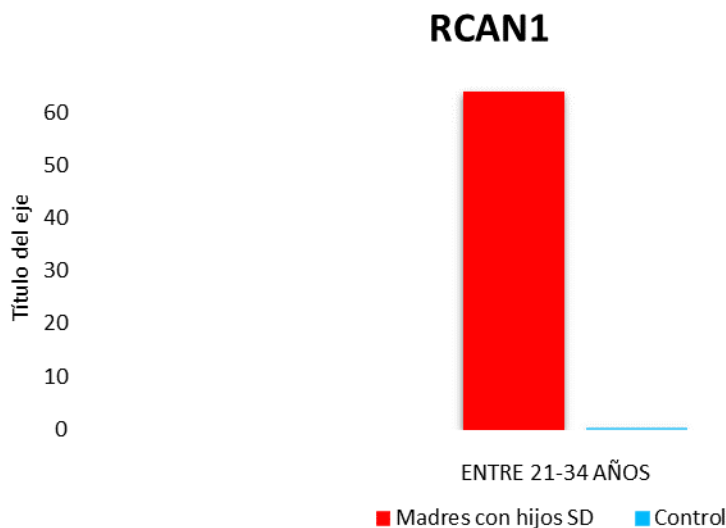


Comparando el comportamiento de los porcentajes de metilación de las madres y de los hijos (Figuras 7 y 20), podemos observar que para las MS y HS existe un decrecimiento entre el primer y segundo grupo de edad, este mismo comportamiento se presenta para las MSD y HSD en el último grupo de edad, donde los porcentajes de ambos aumentan. Para las MS y HS del primer grupo de edad los valores que cubren las regiones HPD resultan similares.

### Gen RCAN1

Figura 21. Medianas de los porcentajes de metilación del gen RCAN1 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



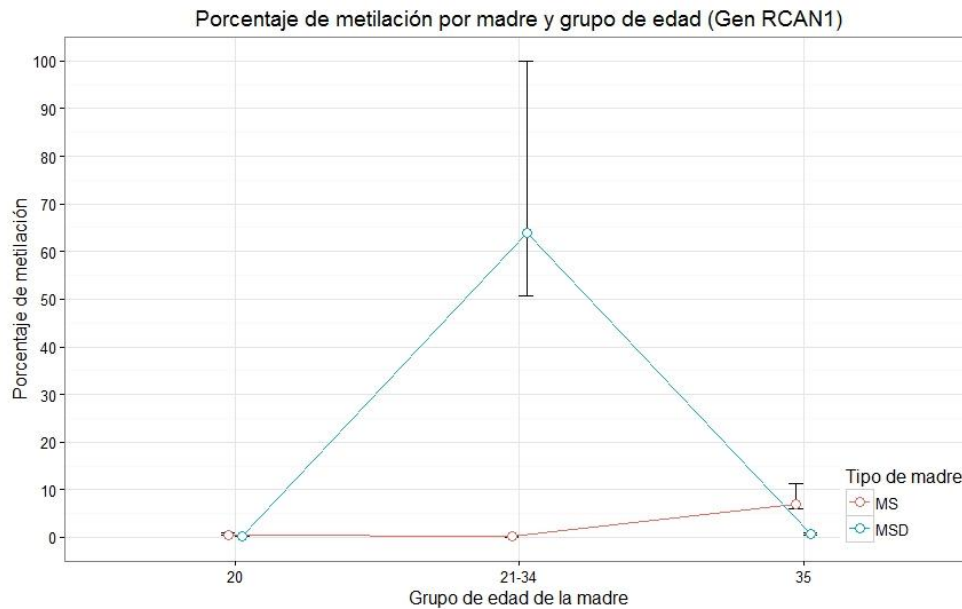


**B.**

Los porcentajes de metilación del gen RCAN1 para las madres, tiene un comportamiento variable entre los tres grupos de edad. En la Figura 22 se puede observar que hay una predominancia en los porcentajes de metilación para las MSD en el grupo de 21 a 34 años, con una mediana de 63,874727% en comparación con la mediana de las MS que es de 0,12554%; y en los porcentajes de las MS en el grupo de mayores a 35 años, las cuales presentan mediana igual a 6,940946% frente a las MSD con 0,668053%.

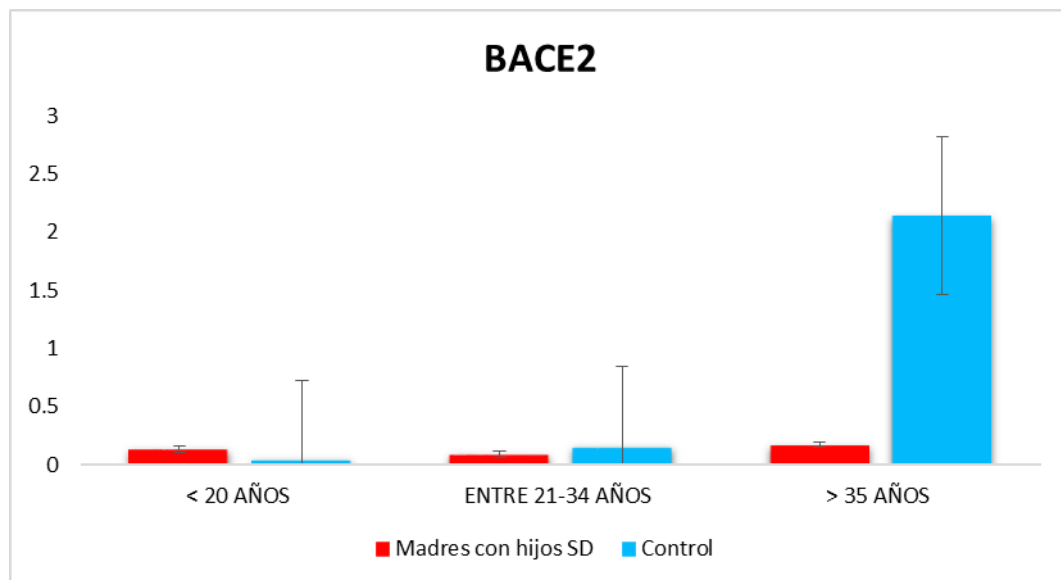


Figura 22. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen RCAN1 y por madre.



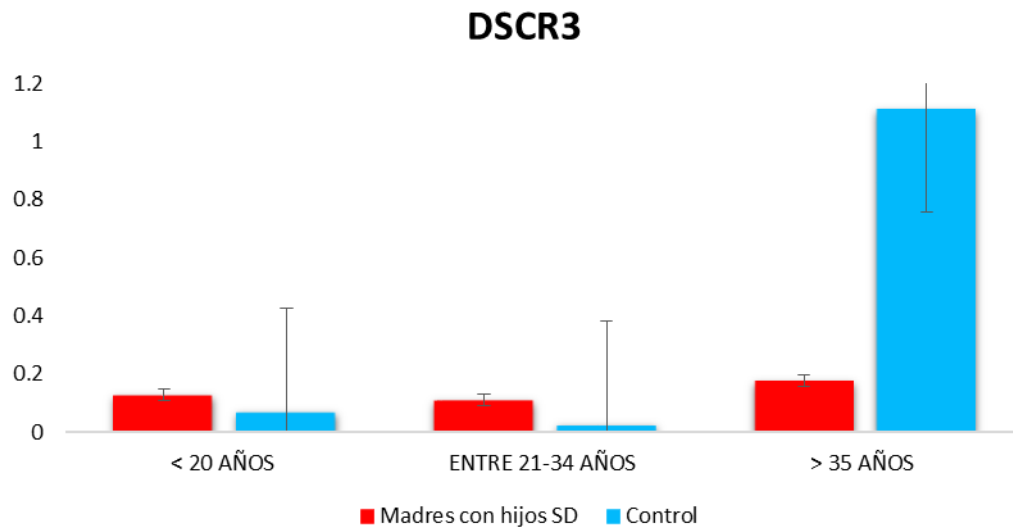
### Gen BACE2

Figura 23. Medianas de los porcentajes de metilación del gen BACE2 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



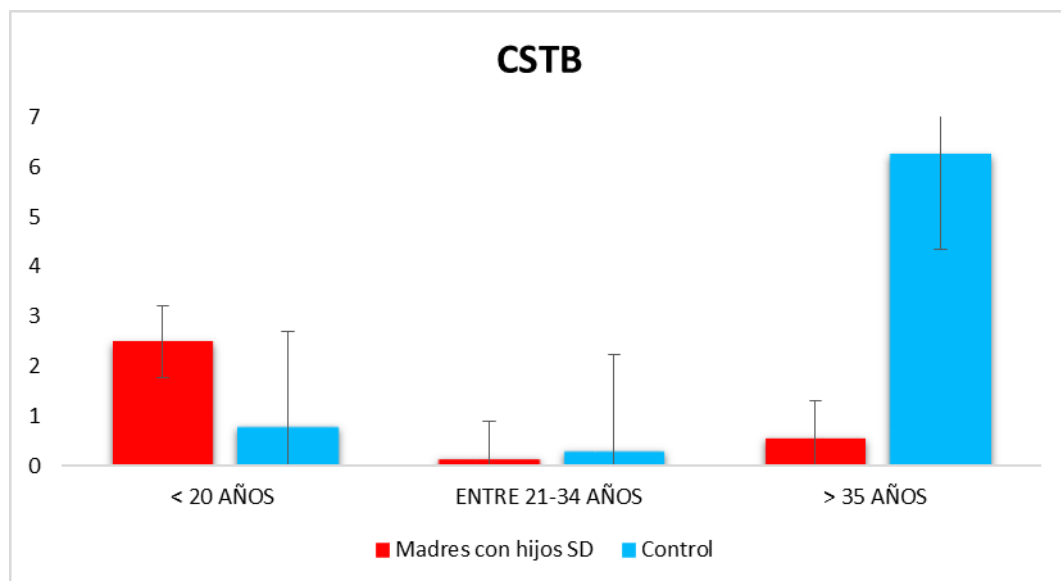
### Gen DSCR3

Figura 24. Medianas de los porcentajes de metilación del gen DSCR3 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



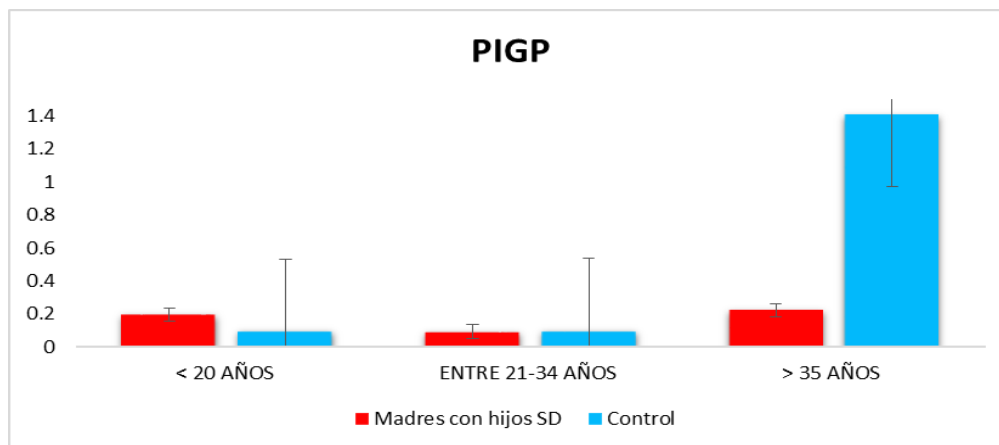
### Gen CSTB

Figura 25. Medianas de los porcentajes de metilación del gen CSTB en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



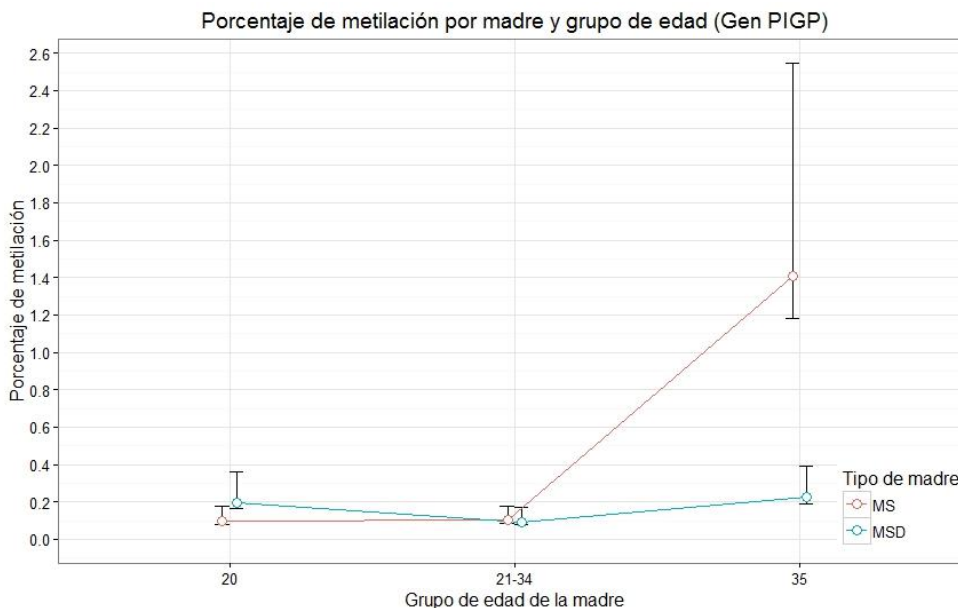
## Gen PIGP

Figura 26. Medianas de los porcentajes de metilación del gen PIGP en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



Para el gen PIGP, el comportamiento de los porcentajes de metilación de las madres resulta predominante para las MS mayores a 35 años, con una mediana de 1,408187% (Figura 27).

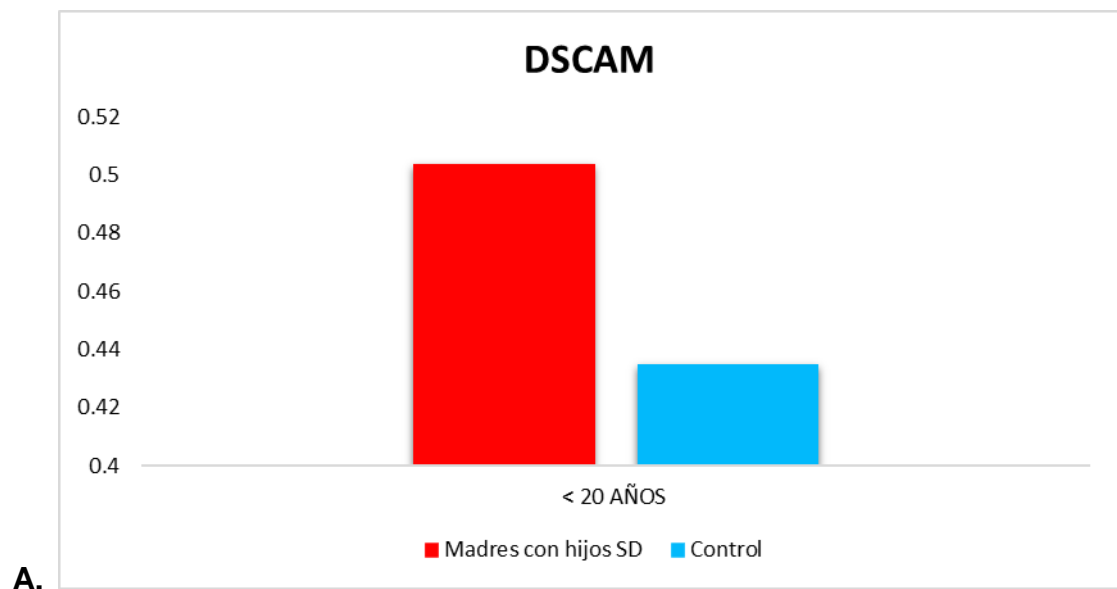
Figura 27. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen PIGP y por madre.



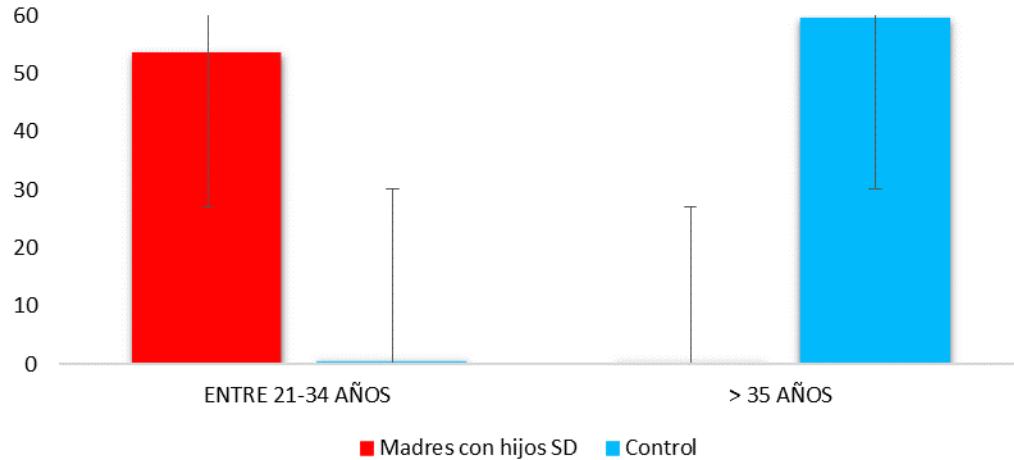
En general se puede decir que el comportamiento de los porcentajes de metilación entre tipos de madres del primer grupo toma valores dentro de regiones muy parecidas, al igual que ocurre en el segundo grupo de edad; este comportamiento se presenta igual en los hijos (Figura 27). Los valores que cubren las regiones HPD de las madres son más altos que las de los hijos. Para las MS y los HS del último grupo de edad, observamos un comportamiento contrario, donde los porcentajes de metilación para la madre aumentan y para el hijo decrece, habiendo un comportamiento no tan variable en los otros grupos de edad.

### Gen DSCAM

Figura 28. Medianas de los porcentajes de metilación del gen DSCAM en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



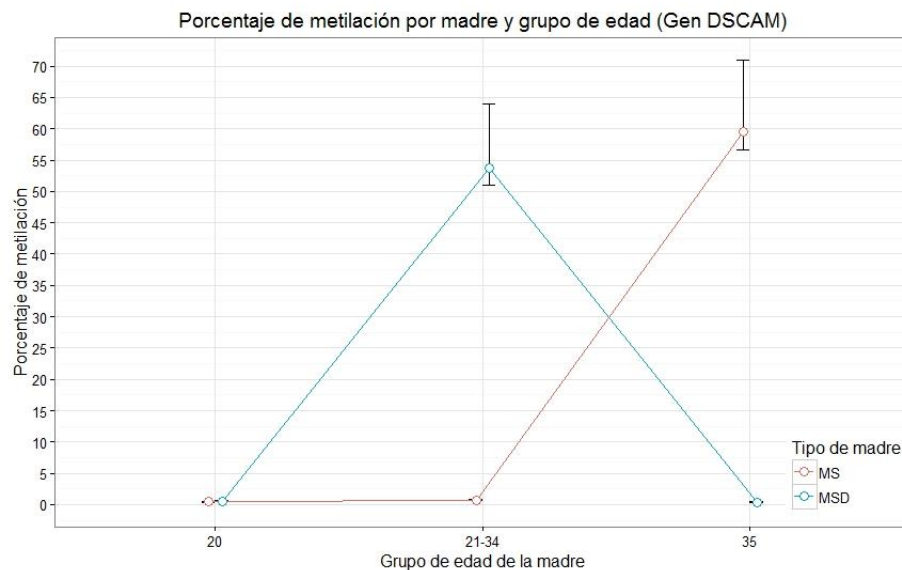
## DSCAM



**B.**

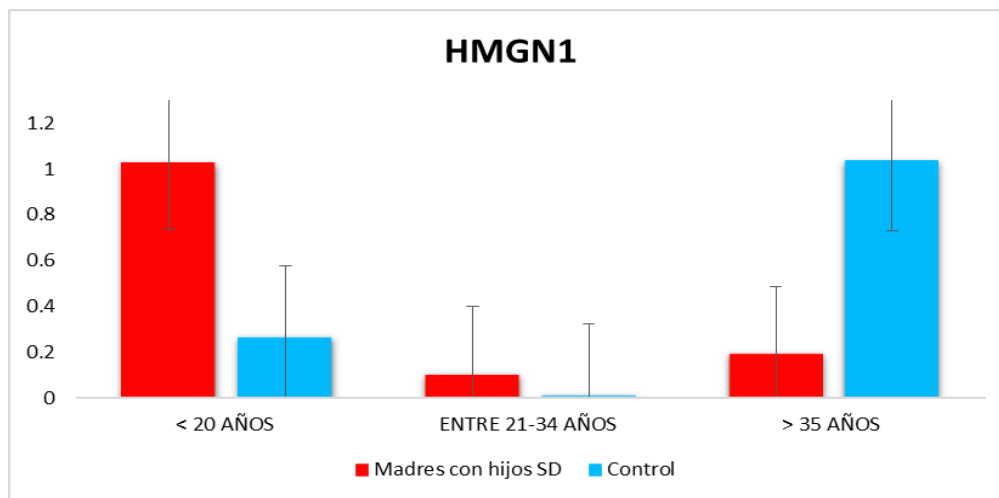
Para el gen DSCAM, los valores de porcentaje de metilación más altos los presentan las MSD entre 21 a 34 años y las MS del último grupo de edad, las cuales presentan medianas de 53,73597% y 59,532933%, respectivamente.

Figura 29. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen DSCAM y por madre.



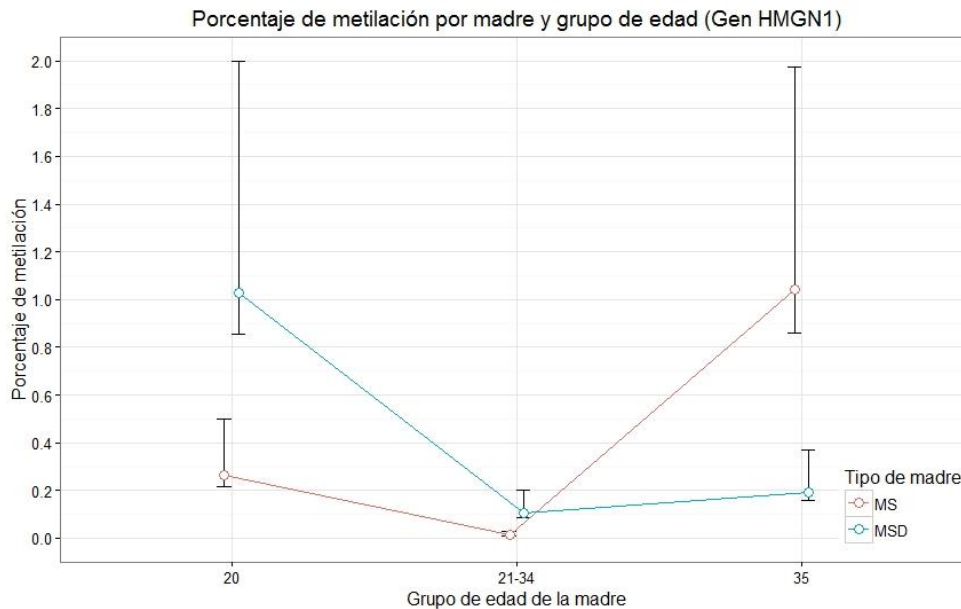
## Gen HMGN1

Figura 30. Medianas de los porcentajes de metilación del gen HMGN1 en madres de niños con síndrome de Down y el grupo control.



Para el análisis de los porcentajes de metilación por madre y grupo de edad del gen HMGN1, se puede evidenciar en la Figura 31, que las MSD menores a 20 años presentan porcentajes altos al igual que las MS mayores de 35 años. En el primer grupo de edad, las MSD presentan una mediana de 1,027244% y las MS de 0,265663%; en el segundo grupo de edad, la mediana para las MSD es de 0,105797% siendo mayor que la MS con una mediana de 0,01419445%; en el tercer grupo, las MS presenta una mediana de 1,040173% y las MSD 0,194008%. El comportamiento de los porcentajes de metilación de las madres entre el primer y segundo grupo resulta similar, y es inverso para los porcentajes entre el segundo y tercero grupo. El porcentaje de metilación de las MS entre 21 a 34 años resulta diferente de los valores que toma las regiones de MS menores a 20 años, MSD entre 21 a 34 años y las mayores a 35 años de acuerdo a un FB igual a 1,88417042 a favor de este segundo grupo de regiones, los cuales resultan ser diferentes a los valores de las MSD menores a 20 años y las MS mayores a 35 años, con un FB igual a 1,92222915 a favor de este último grupo de regiones.

Figura 31. Mediana y regiones HPD del 95% para los porcentajes de metilación del gen HMGN1 y por madre.



Sobre la relación de los porcentajes de metilación de las madres e hijos (Figuras 18 y 31), se puede decir que entre el primer grupo de edad y el segundo, mientras las MSD presentan los porcentajes mayores, en los hijos los HSD presentan los porcentajes menores; y entre el segundo grupo de edad y el tercero, mientras en las madres MS se presentan los valores mayores, los HS presentan los menores.

De acuerdo a las gráficas y al análisis expuesto, se puede decir de manera general que respecto a los hijos con SD se observó en las diferentes Figuras un mismo comportamiento para los genes BACE2, CSTB, RCAN1, PRMT2, DSCAM, HMGN1 y DSCR3, donde entre el grupo de madres menores a 20 años y el grupo de 21 a 34 años, los porcentajes de metilación decrecieron, pero entre el segundo grupo (de 21 a 34 años) y el tercero (mayores a 35 años), los porcentajes de metilación aumentaban. Para las MS se observó un mismo comportamiento para todos los genes entre el segundo y tercer grupo, los porcentajes de metilación entre esos dos grupos aumentó. Para los HS se presentó un comportamiento de decrecimiento en los porcentajes de metilación para todos los genes entre el primer grupo de edad y el segundo,

entre el segundo y tercer grupo se notó un leve crecimiento en los porcentajes. Para las MSD se observó un mismo comportamiento de decrecimiento entre el primer y segundo grupo y un aumento entre el segundo y el tercer grupo, esto ocurrió para los genes BACE2, CSTB, PIGP, PRMT2, HMNG1 y DSCR3; mientras que para los genes RCAN1 y DSCAM el comportamiento era contrario, aumentó entre los primeros dos grupos y decrecía entre los últimos grupos, solo para el gen SIM2, los porcentajes de metilación se comportaron de manera creciente.

De lo anterior, se puede decir que existen diferencias entre los casos y controles de los hijos dependiendo de la edad de la madre. Para hijos con madres menores o iguales a 34 años, los porcentajes de metilación para los HS son más altos que los de HSD, mientras que para hijos con madres mayores o iguales a 35 años, los porcentajes de metilación de los HSD resultan mayores. Esto ocurre para todos los genes, excepto DSCAM. En cuanto a los casos y controles de las madres, se puede decir que el comportamiento de los porcentajes de metilación para los diferentes genes entre los primeros dos grupos de edad varían, la diferencia radica en el último grupo de edad, donde los porcentajes para MS para todos los genes, siempre son mayores que los de MSD.

## **DISCUSIÓN**

### **Metilación en pacientes con síndrome de Down y controles**

Los resultados mostraron perfiles diferenciales de metilación entre los pacientes con síndrome de Down y el grupo control en los tres grupos estudiados. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos en otras investigaciones sobre metilación de genoma completo, en donde se han identificado firmas epigenéticas en varios tejidos SD entre los cuales se incluyen leucocitos, fibroblastos de piel, células bucales, hígado, placenta y cerebro (Chango et al., 2006; kerkel et al., 2010; Obermann-Borst et al., 2011; Jin et al., 2013; Jones et al., 2013; Bacalini et al., 2015; Sailani et al., 2015; Horvath et al., 2015; Mendioroz et al., 2015; Lu et al., 2016; El Hajj et al., 2016). La mayoría de estos estudios evidencian hipermetilación global en SD frente al grupo control, esta hipermetilación en algunas investigaciones fue más marcada en la región promotora de los genes estudiados (Sailani et al., 2015), generando así, una asociación entre la presencia de la copia extra del cromosoma 21 con una alteración en la metilación global del



genoma en SD, lo cual le confiere un papel importante a la epigenética en la etiopatogenia y las características fenotípicas asociadas a la trisomía 21.

Es importante recalcar que las regiones promotoras de muchos genes pueden ser metiladas en las islas CpG, en donde se ha observado que genes con promotores altamente metilados son "silenciados" o "reprimidos" debido a que no pueden ser transcritos. Así, en el grupo de hijos de madres mayores a 35 años se puede observar una notoria hipermetilación en los pacientes con síndrome de Down en comparación con el grupo control, lo cual es concordante con los estudios actuales (kerkel *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2013; Jones *et al.*, 2013; Bacalini *et al.*, 2015; Sailani *et al.*, 2015; Horvath *et al.*, 2015; Mendioroz *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2016; El Hajj *et al.*, 2016). Frente a estos resultados varios autores han sugerido que la hipermetilación observada podría ser un mecanismo para silenciar genes que están más expresados de manera constitutiva en el SD (Chango *et al.*, 2006; kerkel *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2013). Estas explicaciones se basan en el hecho de que las alteraciones epigenéticas pueden ocurrir en los embriones SD durante el desarrollo temprano, las cuales pueden ser una respuesta a la copia adicional del Chr21, confiriendo así, ciertas ventajas de supervivencia a expensas de algunos procesos de desarrollo normales, con el riesgo de conducir a enfermedades elevadas (Jin *et al.*, 2013).

No obstante, el mecanismo por el cual ocurren estos cambios epigenéticos aún no ha sido completamente esclarecido. Debido a esto se ha propuesto que la alteración de la dosis de uno o varios genes reguladores epigenéticos Hsa21 podrían modificar el entorno de la cromatina en las células trisómicas (Bestor *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2016). Estas modificaciones podrían conducir hacia la hipermetilación en varios tejidos y con ello explicar algunos de los fenotipos observados en el SD (Letourneau *et al.*, 2014; Mendioroz *et al.*, 2015; El Hajj *et al.*, 2016). Algunos de esos genes reguladores epigenéticos son DNMT3L, el cual ha recibido bastante atención puesto que es un regulador de ADN metiltransferasa y se encuentra localizado en el cromosoma 21 (Bestor *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2016). DNMT3L se encuentra sobre-expresado en SD y tiene la capacidad de aumentar la actividad de DNMT3a y DNMT3b (Hu *et al.*, 2008), que son las principales enzimas requeridas para la metilación de *novio* del ADN (Okano *et al.*, 1999; Bestor *et al.*, 2000). Adicionalmente estas dos proteínas también están implicadas en la alteración de la neurogénesis y la plasticidad sináptica en el cerebro a través de mecanismos de

metilación (Lu *et al.*, 2016). De esta manera se ha sugerido que la alteración de genes específicos en el cromosoma 21 (es decir, DNMT3L) puede conducir a la hipermetilación del genoma en la trisomía 21, y por consiguiente, después de una onda de metilación *de novo* en el desarrollo temprano, la hipermetilación puede persistir en los tejidos SD (Sailani *et al.*, 2015; El Hajj *et al.*, 2016; Lu *et al.*, 2016).

Con base en lo anterior y en los resultados, se propone un nuevo gen candidato para la regulación epigenética del SD, el gen HMGN1, el cual codifica para una proteína cromosómica no histónica asociada a la generación de la cromatina transcripcionalmente activa (Ding *et al.*, 1994). Hasta la fecha se sabe que la interacción de HMGN1 con los nucleosomas es altamente dinámica (Tremethick *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 2005), y a través de ello puede modular la estructura de la cromatina (Bustin *et al.*, 1995; Postnikov *et al.*, 2010), los niveles de modificación de las histonas (Lim *et al.*, 2004; Ueda *et al.*, 2006), y la reparación del ADN (Birger *et al.*, 2003), generando así, un papel crucial en la regulación epigenética en el SD (Ding *et al.*, 1994; Rochman *et al.*, 2011). Este gen estuvo altamente hipermetilado en los pacientes con síndrome de Down procedentes de madres mayores a 35 años y además se expresa en estructuras como el globo pálido, el núcleo reticular del tálamo y el cuerpo calloso. Debido a esto, se propone que una desregulación en la dosis de este gen puede afectar sustancialmente su función y con ello modificar la homeostasis del epigenoma en la trisomía 21. Esta hipótesis se plantea teniendo en cuenta que estudios previos en ratones han mostrado cómo la pérdida de la proteína HMGN1 interrumpe eventos que controlan la proliferación y crecimiento celular (Birger *et al.*, 2005), mientras que un modesto incremento en HMGN1 induce cambios en las modificaciones de las histonas H3 y la expresión del gen en sí, al igual que puede suprimir la H3K27me3 (Lane *et al.*, 2014), la cual es crítica para la represión de los genes del desarrollo (Boyer *et al.*, 2006; Bracken *et al.*, 2006). Además de esto se ha observado que HMGN1 puede mejorar los niveles de acetilación de H3K14, reducir el nivel de fosforilación de H3S10 y H3S28, y también cambiar el estado de acetilación y metilación de H3K9 (Postnikov *et al.*, 2006).

Por otro lado, entre los sitios de regulación vinculados por HMGN1 se encuentra el promotor del gen que codifica para la proteína de unión a metil-CpG 2 (MeCP2), una proteína nuclear que se expresa durante el desarrollo postnatal en el cerebro de los mamíferos y es muy abundante en

las neuronas (Skene *et al.*, 2010). A pesar de su nombre, MeCP2 puede unir secuencias CpG metiladas y no metiladas (Abuhatzira *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2010) y con ello reprimir o activar la transcripción (Jones *et al.*, 1998; Razin, 1998; Yasui *et al.*, 2007; Chahrour *et al.*, 2008). Las mutaciones o niveles alterados de MeCP2 puede conducir a trastornos del neurodesarrollo como el síndrome de Rett, retraso mental, problemas de aprendizaje, trastornos del espectro autista (TEA) (Samaco *et al.*, 2008), un comportamiento repetitivo, hipotonía, y ansiedad (Ramocki *et al.*, 2010). Hasta ahora, se ha encontrado que MeCP2 se encuentra desregulado en pacientes con síndrome de Down (Nagarajan *et al.*, 2006). Por consiguiente, se propone que HMGN1 tiene un alto impacto sobre la expresión génica y puede ser un candidato importante para el fenotipo SD, ya sea que HMGN1 este sobre o sub-expresado por cambios en la metilación, éste puede afectar la expresión de numerosos genes, como por ejemplo MeCP2 (Abuhatzira *et al.*, 2011), y conllevar a un efecto en cascada para generar las alteraciones observadas en el SD. Sin embargo, se requieren más estudios que permitan explorar la asociación de HMGN1 y la metilación del ADN en el contexto de la trisomía 21.

Por otra parte, los resultados evidenciaron un marcado contraste entre los perfiles de metilación de los pacientes SD de madres mayores a 35 años (los cuales están hipermetilados), con los resultados de los pacientes SD de las madres menores a 20 años (quienes están hipometilados en la mayoría de sus genes). Son pocos los estudios que hasta la fecha han evidenciado hipometilación ya sea global o exclusiva del cromosoma 21 en pacientes con síndrome de Down (Obermann-Borst *et al.*, 2011; Lu & Sheen, 2013). La hipometilación generalmente resulta en un aumento de la expresión génica, lo cual podría explicar la sobre-expresión observada en los genes del Crh21 en la mayoría de los tejidos pertenecientes a pacientes con SD (Lu & Sheen, 2013). Uno de estos estudios asoció el estado de hipometilación global en SD con la presencia de enfermedades cardíacas (Obermann-Borst *et al.*, 2011). Curiosamente uno de los dos pacientes estudiados presentó ductus arterioso persistente, lo cual podría explicar los resultados observados. Sin embargo, hay que recordar que aunque algunas perturbaciones epigenéticas pueden ser conservadas en los diferentes tejidos, los efectos funcionales de estas alteraciones son propensas a ser temporales y específicas (Jin *et al.*, 2013), además que son muchos los factores ambientales que podrían estar influenciado el evidente contraste en los resultados, especialmente los que tienen que ver con los factores maternos y otros modificadores aún desconocidos. Por consiguiente, hacen falta más estudios que permitan

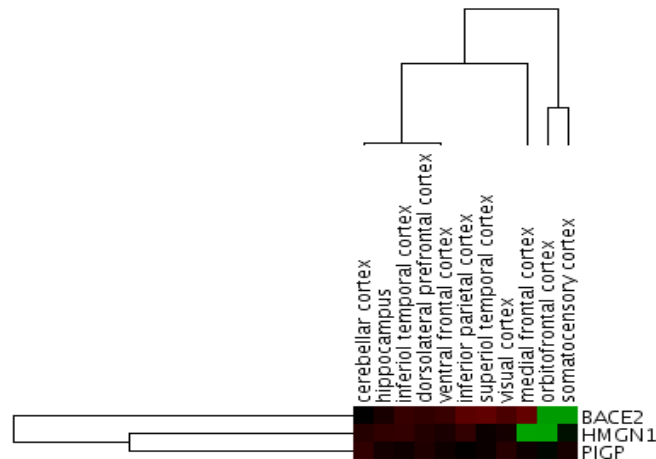
corroborar una asociación entre estados de hipometilación en SD y el desarrollo de cardiopatías en estos pacientes. Sin embargo, de manera general la alteración en el metiloma SD sugiere la interrupción de muchas vías metabólicas que también implican la fosforilación oxidativa, ubiquitinación y hasta la señalización de la insulina en la trisomía 21 (Lu & Sheen, 2013), resultando así, en alteraciones importantes que podrían ayudar a explicar tanto la etiología como el fenotipo asociado a este síndrome.

### **Genes DSCR y la regulación cognitiva**

Los genes estudiados son candidatos que podrían explicar las disfunciones cognitivas y motoras observadas en el SD. De acuerdo al análisis bioinformático se pudo establecer que estos genes se expresan fuertemente en estructuras cerebrales como la formación reticular, la cual está relacionada con comportamientos homeostáticos como la respiración, el tono vascular, el procesamiento viserosensorial, el dolor, la locomoción y el control del equilibrio (Gray, 2013; Pindrik et al. 2014). Por su parte el Globo Pálido participa en la manutención del tono muscular basal para los movimientos voluntarios, lo que permite realizar actividades de precisión tanto con las manos como con los pies, además de ayudar a mantener al cuerpo en una posición específica (Graybiel, 2005; Packard & Knowlton, 2002). Los genes más expresados en estas estructuras fueron BACE2, CSTB y PIGP. Hasta la fecha otros estudios también han mostrado que por ejemplo BACE2 se expresa en el cerebro humano, y se ha planteado que su co-sobreexpresión con el gen APP podría promover el fenotipo neurodegenerativo del Alzheimer temprano observado en los pacientes con SD (Wilcock & Griffin, 2013; Korbolina *et al.*, 2014). No obstante, éste no es el único gen DSCR que parece estar relacionado con la EA de los pacientes con síndrome de Down, por su parte el incremento en la expresión del gen CSTB parece estar asociado con el desarrollo de las placas seniles observadas en esa patología (Perluigi *et al.*, 2014). Además de ello, las mutaciones en CSTB también están asociadas con el desarrollo de la epilepsia mioclónica progresiva del tipo Unverrich-Lundborg (EPM1), y su pérdida ha mostrado generar una disminución de las células granulares del cerebelo por apoptosis (Weinhaeusel *et al.*, 2003; Lalioti *et al.*, 1999; Perluigi *et al.*, 2014; Block *et al.*, 2015). De acuerdo a los resultados, este gen se expresa en los núcleos cerebelares, por lo que el desbalance de su dosis podría ser un factor importante en la desregulación de las funciones asociadas a esta estructura.

Del mismo modo los genes PIGP y SIM2 están sobre-expresados en la formación reticular, el globo pálido y el cerebelo. Por su parte el cerebelo participa en diferentes actividades, que incluyen la marcha, el equilibrio, la coordinación motora y los procesos cognitivos (Manto et al, 2012; Villanueva, 2012; Koziol et al, 2014). Otros estudios han encontrado que tanto PIGP como SIM2 se expresan en el cerebro durante el desarrollo embrionario y fetal, sugiriendo así, un papel potencial en el desarrollo del SNC humano (Ferrando-Miguel *et al.*, 2004; Okui *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Además de esto, las regiones cerebrales en las que se expresa SIM2 corresponden a las estructuras alteradas en los pacientes con SD (Okui *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). De manera general, los genes estudiados participan en varios procesos neurológicos que tienen que ver con la neurogénesis, diferenciación y crecimiento celular, apoptosis, entre otros. Un gen clave es HMGN1 el cual como ya se ha mencionado podría ser un importante regulador epigenético. Este gen exhibe una fuerte sobre-expresión en el cuerpo calloso, que junto con el hipotálamo, el hipocampo y la amígdala son los principales responsables de la formación de memorias, agregando que un daño en el cuerpo calloso puede generar una alteración de la conectividad funcional interhemisférica (Quigley *et al.*, 2003; Vega-Pons *et al.*, 2017). Con base en esto, se realizó una comparación con los resultados de Olmos y colaboradores (2016) para los genes BACE2, HMGN1 y PIGP en diferentes estructuras cerebrales. En la Figura 32 se puede observar que estos tres genes se encuentran subexpresados en cerebros procedentes de pacientes con síndrome de Down menores a 3 años, lo cual confirma que la desregulación en la metilación de estos genes puede afectar su expresión génica en los pacientes con SD.

Figura 32. Análisis de conglomerados para los genes BACE2, HMGN1 y PIGP a partir de los resultados de Olmos y colaboradores (2016).



En resumen las estructuras que presentaron mayor expresión en este estudio están fuertemente relacionadas con el control motor, pero también se ha observado que intervienen en procesos cognitivos, funciones sensoriomotoras y emocionales (Lincoln et al. 2012, Micheli et al., 1998), las cuales son funciones normalmente comprometidas en pacientes SD. Además de ello, todos los genes estudiados exhiben perfiles diferenciales de metilación entre los pacientes con síndrome de Down y el grupo control, por consiguiente, se propone que la desregulación de estos genes debido a cambios en su patrón de metilación, generaría una alteración de su función lo que podría conllevar a una disfunción del aprendizaje, la memoria, enfermedades hipocinéticas, formación prematura de placas seniles, escasa densidad neuronal y muchos otros problemas que son característicos de patología.

### Metilación materna

La meiosis en el ovario fetal se inicia alrededor de las semanas 11-12 de gestación (Gondos et al., 1986) y se detiene a finales de la profase I después del apareamiento, la sinapsis y la recombinación. A partir de ese momento el proceso se reanuda al inicio de la pubertad después que el folículo recibe la señal hormonal adecuada y completa la meiosis I (MI), en ese momento progresa a través de la metafase de la meiosis II (MII) donde se detiene hasta que se fertiliza y la meiosis se completa. De esta manera, se puede decir que el ovocito individual permanece

detenido en la profase I alrededor de 10 a 50 años, dependiendo del tiempo de ovulación en la vida reproductiva, lo cual genera que ese evento prolongado de crecimiento de ovocitos sea susceptible a errores durante tres etapas claves (Hassold *et al.*, 2007). La primera de ellas es durante la profase en el ovario fetal, en el que el cambio en el patrón habitual de recombinación podría conducir a la posterior formación de ovocitos aneuploides. La segunda etapa se da durante el crecimiento folicular en el cual la meiosis permanece detenida y las condiciones genéticas y ambientales tienen la oportunidad de acumularse en el medio ovárico; y finalmente la otra fase de riesgo es durante la maduración del ovocito, la cual se asocia con el efecto adverso del avance de la edad materna sobre los componentes proteicos involucrados en el sistema de separación cromosómico y el rápido deterioro de los ambientes endocrinos (Dey & Ghosh, 2011).

Según los resultados obtenidos, las madres menores a 20 años están hipermetiladas en la mayoría de los genes, mientras que las madres mayores a 35 años están hipometiladas en todos los genes estudiados. Por su parte, el grupo de madres entre los 21 y 34 años parecen mostrar una transición entre ambos grupos, pero su tendencia es hacia la hipermetilación al igual que las madres menores. De acuerdo a estos resultados se propone que el riesgo de tener un hijo con síndrome de Down puede estar altamente influenciado por cambios en los patrones de metilación, los cuales pueden afectar la segregación normal del cromosoma 21 y generar con ello la trisomía. No obstante, estos cambios epigenéticos pueden deberse a razones diferentes e intrínsecas de la edad materna, lo cual podría explicar el evidente contraste entre la hiper y la hipometilación entre las madres jóvenes y las mayores a 35 años respectivamente. Anteriormente, ya se había mencionado que el principal factor de riesgo para tener un hijo con SD es la edad materna avanzada debido a la hipótesis del “ovocito viejo” (Homer, 2011), no obstante, se ha planteado que esta hipótesis no parece ser viable para las madres jóvenes, y por tanto los mecanismos desencadenantes para la trisomía 21 podrían no ser los mismos en estos dos grupos de edad (madres jóvenes vs. madres de edad avanzada). En consonancia estudios previos han asociado que la edad materna avanzada se relaciona significativamente con errores en MI y MII, sin embargo, la relación entre los errores de MI y MII difiere según la edad materna. Allen y colaboradores (2009), mostraron que esta proporción es menor entre las mujeres menores de 19 años y son mayores en las de 40 años. Del mismo modo, otros estudios revelaron que el fallo en el intercambio telomérico es un factor de riesgo para la no disyunción

del Chr21 en MI, y que este factor es independiente de la edad materna, sin embargo, en las mujeres de edad avanzada el fallo se da predominantemente en los quiasmas pericentroméricos en MII, generando así, que este sea un factor de riesgo dependiente de la edad de la madre (Ghosh *et al.*, 2009; Ghosh *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y estos informes, se puede considerar que la hipometilación materna es un factor particularmente importante para el desarrollo de trisomía 21 en los hijos de las madres de edad avanzada. Hay que señalar que el nivel de folato disminuye con el envejecimiento debido a la disminución de la ingesta de ácido fólico y a la disponibilidad alterada de folato (Jacob *et al.*, 1998; Rampersaud *et al.*, 2000). Por lo tanto, la interrupción del metabolismo del folato mediada por el envejecimiento puede ser una de las razones que causan la metilación anormal del ADN observada en los resultados. Adicional a esto, es necesario mencionar que algunos informes han mostrado que el crecimiento y la maduración de los ovocitos es particularmente sensible a los cambios nutricionales, químicos y del entorno endocrino (Gu *et al.*, 2015). Ejemplo de esto es que la metilación del ADN en los ovocitos de ratones se altera por la diabetes y la obesidad materna (Ge *et al.*, 2013a, b, 2014b), igualmente se ha evidenciado que las deficiencias o excesos en una serie de macro y micronutrientes están asociados con problemas significativos en el comportamiento reproductivo, la fertilidad, el desarrollo fetal, y la salud de la descendencia a largo plazo (Walsh *et al.*, 2011; Sinclair & Watkins, 2013; Dupont *et al.*, 2014). Por su parte, Steegers-Theunissen y colaboradores en el 2013, mostraron en modelos animales, que el establecimiento de las modificaciones epigenéticas en los ovocitos se ve afectada por las dietas maternas y las enfermedades no transmisibles. Si estos cambios epigenéticos se producen en la línea germinal, pueden afectar el desarrollo embrionario y la salud de la descendencia, y este efecto además podría incluso extenderse a más generaciones (Ge *et al.*, 2015).

Además de la ingesta deficiente de folato, otros factores también podrían ser factores claves para la regulación del metiloma materno, entre éstos se encuentra la regulación y actividad hormonal, la cual sufre grandes cambios en los estadios menopaúsicos y pre-menopáusicos (Santoro & Randolph, 2011). En consecuencia, se ha planteado que el nivel sub-óptimo de señales hormonales genera un mayor porcentaje de errores en la meiosis durante el envejecimiento del ovario. De este modo, hay una disminución en el recuento de folículos



antrales, junto con la disminución del conjunto total de ovocitos, generando así, un desequilibrio en el ambiente hormonal ovárico (Warburton, 2005), que predispone a las mujeres para la concepción aneuploide (Freeman *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2005). Concordante a esto, un estudio mostró que la terapia de sustitución de estrógenos en la menopausia reduce la concentración total de homocistina en plasma y genera el aumento de la metilación del ADN genómico en células mononucleares (Friso *et al.*, 2007). Por otro lado, en el cerebro de ratones, el porcentaje de metilación en el promotor del receptor de estrógenos alfa es modulado por la expresión de estrógeno (Schwarz *et al.*, 2010). Sugiriendo así, que la metilación del ADN no sólo se ve afectada por las hormonas presentes en los tejidos, sino que también por las que están en los ovocitos, de hecho en los seres humanos y en los ratones, los patrones de metilación de Peg1 y H19 cambian por las hormonas utilizadas para inducir la superovulación de ovocitos en crecimiento (Sato *et al.*, 2007).

Adicionalmente, entre los genes analizados existe un gen clave que podría estar influyendo en la regulación del receptor de estrógenos. Varios estudios han demostrado que el gen PRMT2 tiene actividad metiltransferasa, ejemplo de esto es que la ausencia de PRMT2 en ratones resulta en una disminución de la metilación de STAT3, el cual actúa como mediador en la expresión de diversos genes importantes en procesos como la proliferación celular y la apoptosis (Iwasaki *et al.*, 2010), del mismo modo PRMT2 puede regular negativamente la transcripción de kappa B dependiente generando que las células sean más susceptibles a los estímulos apoptóticos (Ganesh *et al.*, 2006). No obstante, uno de los hallazgos más interesantes como co-activador de la expresión génica, es que PRMT2 puede afectar la activación de varios receptores tales como el receptor de progesterona (PR), el receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) (Qi *et al.*, 2002; Meyer *et al.*, 2007; Baldwin *et al.*, 2014). De manera adicional PMRT2 se expresa fuertemente en la próstata y los ovarios humanos (Meyer *et al.*, 2007). Lo que conlleva a creer que PRMT2 puede ser un regulador importante del epigenoma materno. Según los resultados obtenidos este gen está hipometilado tanto en madres de niños con síndrome de Down menores de 20 años como en las mayores a 35 años, esta alteración en PRMT2 podría conducir a alteraciones en la regulación de ER y con ello ejercer una actividad sinérgica para generar un epigenoma aberrante. Para ello hay que tener en cuenta que varios grupos han demostrado una conexión del estrógeno y el ER en la regulación epigenética. Muchos informes sugieren que el ER coopera con co-activadores para

regular epigenéticamente a genes de respuesta al estrógeno. De esta manera, la transcripción mediada por ER requiere la adición de algunos cambios epigenéticos y la eliminación de otros. Un ejemplo es que la exposición a estrógenos o la pérdida de ER conducen a modificaciones epigenéticas en los genes diana de ER, esas modificaciones incluyen la regulación directa en la actividad de DNMTs (Hervouet *et al.*, 2013; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2015).

Por consiguiente, se propone que PRMT2 podría ser un regulador clave de los mecanismos epigenéticos que controlan la calidad de los ovocitos. Hay que recalcar que la progresión meiótica se acompaña de cambios epigenéticos (Jones *et al.*, 2008). Conceptualmente, los eventos epigenéticos pueden asegurar la expresión apropiada de genes implicados en la meiosis, contribuir a la integridad cromosómica y a la dinámica de los cromosomas asociados con la progresión meiótica (Kim *et al.*, 2015). En ovocitos MII de ratones de 35 a 40 semanas de edad, la expresión de la proteína de dnmt1, dnmt3a, dnmt3b y dnmt3l es mucho más baja que en los ovocitos MII de ratones de 6 a 8 semanas de edad (Yue *et al.*, 2012). Por otra parte, se ha visto que la ausencia de dnmt3l conduce a la sinapsis no homóloga generalizada en la etapa de paquiteno, agregando que los informes muestran que la metilación *de novo* también contribuye significativamente en la homeostasis de los procesos meióticos en ratones (Kota & Feil, 2010). Sin embargo, se necesita más evidencia experimental para poder dilucidar cómo la desregulación de PRMT2 podría afectar directa o indirectamente a otras proteínas específicas metil-sensibles encargadas de mantener la arquitectura necesaria para la meiosis.

Finalmente, como ya se ha mencionado, los errores generados en MII han mostrado estar asociados a la edad materna avanzada (Lamb *et al.*, 1997; Oliver *et al.*, 2012), estos errores podrían estar influenciados por diversos mecanismos entre los que incluimos los factores ambientales como la variación en los niveles de folato y factores hormonales, que en última instancia pueden afectar la estructura de la cromatina y con ello generar la hipometilación observada en las madres SD mayores a 35 años. Sin embargo, no queda claro cómo las madres menores de 20 años exhiben hipermetilación en la mayoría de sus genes y cómo estos mecanismos se relacionan con el desarrollo del SD. Queda claro que mientras los errores en MII están asociados a la edad materna avanzada, los errores en MI no parecen estar influenciados por la edad de la madre, por lo cual es posible plantear que el tener un hijo con

SD a una edad joven puede deberse en gran medida a errores generados en la MI, y por lo tanto están vinculados a los errores de recombinación que ocurrieron o iniciaron durante el desarrollo fetal de la madre en el cuerpo de la abuela materna (Kuliev *et al.*, 2011). Debido a esto, se puede decir que el ovocito de las madres jóvenes ya viene alterado y la hipermetilación observada en estas madres podría ser el resultado de esa disregulación, en donde la compleja interacción entre los genes y el medio ambiente el cual incluye la dieta de la abuela materna, estilos de vida y el genotipo de la madre podrían ser de relevancia para la mala segregación del cromosoma 21. En este sentido, se debe tener en cuenta el consumo de alcohol en la peri-concepción, el hábito de fumar, diversos micronutrientes, como el zinc, que puede afectar a las actividades de las enzimas tales como BHMT y MTR (Coppedè, 2015), al igual que la exposición a agentes químicos los cuales son considerados perturbadores endocrinos (por ejemplo BPA), debido a que han mostrado gran capacidad para generar cambios epigenéticos, y a su vez causar efectos transgeneracionales en numerosos órganos y sistemas (Gore *et al.*, 2015; Eichenlaub-Ritter *et al.*, 2015). Esto genera que en el nacimiento de un niño con síndrome de Down se deba tener en cuenta la edad materna y con ello el posible origen del error meiótico, así como la dieta, los hábitos y estilos de vida de al menos dos generaciones (Coppedè, 2015).

Tanto en las madres SD menores de 20 años como en las mayores a 35 años, se observó un remarcado epigenético frente a su descendencia. Las madres menores se encuentran hipermetiladas mientras que sus hijos SD están hipometilados. Por el contrario las madres mayores están hipometiladas y sus hijos SD se encuentran hipermetilados. Datos similares ya han sido exhibidos por otras investigaciones, de hecho la diferencia en la metilación del ADN entre la madre y el feto es actualmente la modificación epigenética más caracterizada para la posible detección prenatal del SD (Cicero *et al.*, 2001; Shipp & Benacerraf, 2011). Ejemplo de esto es el gen de la fosfodiesterasa, PDE9A, el cual es un marcador epigenético, ya que está totalmente metilado en la sangre materna (M-PDE9A) y no metilado en la placenta (U-PDE9A) (Sillence *et al.*, 2013). Los resultados muestran posibles candidatos que podrían ser tenidos en cuenta como marcadores epigenéticos para la detección prenatal del SD, además que son genes que han sido ampliamente asociados con el fenotipo de la trisomía 21. Adicionalmente, es importante recordar que los cambios epigenéticos son reversibles, generando así, que sean objetivos interesantes para la terapia génica o para generar nuevas investigaciones más

detalladas que permitan dilucidar sobre su papel en el desarrollo y las manifestaciones fenotípicas del síndrome de Down.

## **PRINCIPALES CONCLUSIONES Y/O RECOMENDACIONES**

### **Conclusiones**

- Se obtuvieron patrones diferenciales de metilación en la región promotora de los genes estudiados entre los pacientes con síndrome de Down y el grupo control.
- Las alteraciones epigenéticas evidenciadas en los pacientes con SD contribuyen a la disregulación de la expresión génica.
- Los cambios en los patrones de metilación en los genes DSCR pueden contribuir al déficit cognitivo característico del síndrome de Down.
- Los factores epigenéticos que influyen en el nacimiento de un niño con SD son diferentes en las madres menores de 20 años y las mayores a 35 años.

### **Recomendaciones**

Los genes estudiados son candidatos importantes para contribuir al desarrollo del síndrome de Down. Sin embargo, aunque la epigenética parece influenciar en la patogénesis de esta trisomía, se necesitan más enfoques experimentales que permitan comprender la compleja respuesta genómica, celular y tisular a esta aneuploidía cromosómica.

Del mismo modo, se necesitan otros estudios que permitan establecer la relación entre el riesgo de nacimiento de un niño con síndrome de Down y los factores ambientales. No obstante, hay que tener en cuenta que esto solo podría aclararse con estudios que incluyan tres generaciones diferentes (la abuela materna, la madre y el embrión SD en desarrollo), en donde se evalúen factores como la presencia de polimorfismos de la vía del folato, el consumo de alcohol,

cigarrillos, hábitos alimenticios y la naturaleza del error meiótico que condujo a la mala segregación del cromosoma 21.

### 3. Productos:

**Tabla No. 1. Cantidad y tipo de productos pactados en el *Acta de Trabajo y Compromiso* y productos finalmente presentados**

TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS	No. de PRODUCTOS PRESENTADOS
<b>Productos de nuevos conocimientos</b>		
Artículo completo publicado en revistas A1 o A2	1	1
Artículo completo publicados en revistas B	0	
Artículo completo publicados en revistas C	0	
Libros de autor que publiquen resultados de investigación	0	
Capítulos en libros que publican resultados de investigación	0	
Productos o procesos tecnológicos patentados o registrados	0	
<input type="checkbox"/> Prototipos y patentes	0	
<input type="checkbox"/> Software	0	
Productos o procesos tecnológicos usualmente no patentables o protegidos por secreto industrial	0	



TIPO DE PRODUCTOS	No. de PRODUCTOS PACTADOS		No. de PRODUCTOS PRESENTADOS	
Normas basadas en resultados de investigación	0			
<b>Formación de recursos humanos</b>	No. de estudiantes vinculados	No. de tesis	No. De estudiantes Vinculados	No. De tesis
Estudiantes de pregrado	0	0		
Semillero de Investigación	2	0	2	0
Estudiantes de maestría	1	1	1	1
Estudiantes de doctorado	0	0		
<b>Productos de divulgación</b>				
Publicaciones en revistas no indexadas	0			
Ponencias presentadas en eventos (congresos, seminarios, coloquios, foros)	No. de ponencias nacionales	No. de ponencias internacionales	No. de ponencias nacionales	No. de ponencias internacionales
<b>Propuesta de investigación</b>	2	0	2	
Propuestas presentadas en convocatorias externas para búsqueda de financiación.	1		0	

**Tabla No. 2. Detalle de productos.**

Para cada uno de los productos obtenidos y relacionados en la tabla anterior, indique la información solicitada para cada uno, anexando copia de las respectivas constancias. Como

anexo a esta guía encontrará el instructivo para instructivo para la revisión de informes finales y productos

### Productos de nuevos conocimientos

Tipo de producto:	Artículo
Nombre General:	<b>Revista:</b> Colombia Médica. (Año 2014). <b>Vol:</b> 45. <b>Núm:</b> 4. <b>Págs:</b> 154 – 161.
Nombre Particular:	Global differential expression of genes located in the Down Syndrome Critical Region in normal human brain
Ciudad y fechas:	Santiago de Cali, 30 de diciembre de 2014.
Participantes:	Julio Cesar Montoya, Dianora Fajardo, Ángela Peña, Adalberto Sánchez, Martha Domínguez, José María Satizábal, Felipe García-Vallejo.
Sitio de información:	US National Library of Medicine National Institutes of Health (Pubmed)
Formas organizativas:	Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-

### Formación de recursos humanos

Tipo de producto:	Semillero de Investigación
Nombre General:	Vinculación al curso de Pasantía de Investigación I
Nombre Particular:	Vinculación al curso de Pasantía de Investigación I
Ciudad y fechas:	Santiago de Cali, semestre febrero-junio de 2015.
Participantes:	Daniela Fernanda Ruiz. Código. 201438570. María Alejandra Abonía Cabezas. Código. 201241240.
Sitio de información:	Sistema de registro académico. Acta de Propiedad intelectual.
Formas organizativas:	Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-

Tipo de producto:	Tesis de Maestría
Nombre General:	Perfiles de metilación de genes localizados en la región crítica del síndrome de Down en el DNA de madres sanas y sus hijos con síndrome de Down en la ciudad de Cali.



Nombre Particular:	Perfiles de metilación de genes localizados en la región crítica del síndrome de Down en el DNA de madres sanas y sus hijos con síndrome de Down en la ciudad de Cali.
Ciudad y fechas:	Santiago de Cali, 13 de febrero de 2017.
Participantes:	Myriam Dianora Fajardo. Código. 1300643.
Sitio de información:	Biblioteca Mario Carvajal Acta de Propiedad intelectual.
Formas organizativas:	Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-

### **Productos de divulgación**

Tipo de producto:	Ponencia en congreso.
Nombre General:	Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas. (Año 2016). <b>Núm:</b> 28. <b>Supl:</b> 1. <b>Págs:</b> 94.
Nombre Particular:	Metilación CpG en promotores de genes de la región crítica del síndrome de Down en un modelo pareado de madres y sus hijos con SD en Cali.
Ciudad y fechas:	Armenia, 19 de octubre de 2016.
Participantes:	Dianora Fajardo, Lina Johanna Moreno, Jairo Alarcón, Julio Cesar Montoya, José María Satizábal, Adalberto Sánchez y Felipe García-Vallejo.
Sitio de información:	MEMORIAS LI CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS. ISSN 0120-4173 ISSN Electrónico 2500-7459.
Formas organizativas:	Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-

Tipo de producto:	Ponencia en evento institucional.
Nombre General:	VIII SIMPOSIO DE INVESTIGACIONES EN SALUD – Facultad de Salud, Universidad del Valle.
Nombre Particular:	Metilación CpG de la RCSD en hijos con SD.
Ciudad y fechas:	Santiago de Cali, 26 de octubre de 2016.
Participantes:	Dianora Fajardo, Lina Johanna Moreno, Jairo Alarcón, Julio Cesar Montoya, José María Satizábal, Adalberto Sánchez y Felipe García-





	Vallejo.
Sitio de información:	MEMORIAS VIII SIMPOSIO DE INVESTIGACIONES EN SALUD – Facultad de Salud, Universidad del Valle. <a href="http://salud.univalle.edu.co/investigacion-en-salud/investigacion-simposios">http://salud.univalle.edu.co/investigacion-en-salud/investigacion-simposios</a>
Formas organizativas:	Laboratorio de biología molecular y patogénesis -LABIOMOL-

#### **4. Impactos actual o potencial:**

El presente estudio tiene gran importancia académica y social puesto da a conocer que existen diferencias entre los patrones de metilación de los genes estudiados entre los pacientes con síndrome de Down y el grupo control. Estas variaciones tienen consecuencias en la expresión de estos genes y conllevan a alteraciones en su función. Por lo tanto, estos resultados permiten reconocer a la metilación del DNA como un factor importante para el desarrollo del síndrome de Down y de su fenotipo neurocognitivo, puesto que muchos de estos genes se expresan en el cerebro y participan en el desarrollo del sistema nervioso y diversos procesos que regulan la actividad cerebral.

Adicionalmente, la tecnología epigenética para el estudio del SD en Colombia es una importante innovación, la cual abre un nuevo campo de investigación en el país, el cual necesita más enfoques experimentales para poder comprender la compleja respuesta genómica, celular y tisular a esta aneuploidía cromosómica.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abdel-Hady S, Afifi HH, Abdel Ghany EA, Taher MB, Eid MM. Micronucleus assay as a biomarker for chromosome malsegregation in young mothers with Down syndrome children. Genet Couns. 2015;26(1):13-9.

Abuhatzira L, Makedonski K, Kaufman Y, Razin A, Shemer R. MeCP2 deficiency in the brain decreases BDNF levels by REST/CoREST-mediated repression and increases TRKB production. Epigenetics. 2007;2:214–222.

Abuhatzira L, Shamir A, Schones DE, Schäffer AA, Bustin M. The Chromatin-binding Protein HMGN1 Regulates the Expression of Methyl CpG-binding Protein 2 (MECP2) and Affects the Behavior of Mice. *J Biol Chem*. 2011;286(49):42051-62.

Alegría-Torres JA, Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*. 2011; 3(3): 267–277.

Allen EG, Freeman SB, Druschel C, Hobbs CA, O'Leary LA, Romitti PA, et al. Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum. Genet*. 2009;125:41–52.

Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S. Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet*. 2004;5(10):725-38.

Bacalini MG, Gentilini D, Boattini A, Giampieri E, Pirazzini C, Giuliani C, et al. Identification of a DNA methylation signature in blood cells from persons with Down syndrome. *Aging*. 2015;7:82-96.

Baldwin RM, Morettin A, Côté J. Role of PRMTs in cancer: Could minor isoforms be leaving a mark?. *World J Biol Chem*. 2014;5(2):115-29.

Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Human molecular genetics*. (Research Support). 2000;9(16):2395-2402.

Beyan H, Down TA, Ramagopalan SV, Uvebrant K, Nilsson A, Holland ML, et al. Guthrie card methylomics identifies temporally stable epialleles that are present at birth in humans. *Genome Research*. 2012;(22):2138-45.

Birger Y, West KL, Postnikov YV, Lim JH, Furusawa T, Wagner JP, et al. Chromosomal protein HMGN1 enhances the rate of DNA repair in chromatin. *EMBO J*. 2003;22;1665–1675.

Birger Y, Catez F, Furusawa T, Lim JH, Prymakowska-Bosak M, West KL, et al. Increased Tumorigenicity and Sensitivity to Ionizing Radiation upon Loss of Chromosomal Protein HMGN1. *Cancer Res*. 2005;65(15):6711-8.

Block A, Ahmed MM, Dhanasekaran AR, Tong S, Gardiner KJ. Sex differences in protein expression in the mouse brain and their perturbations in a model of Down syndrome. *Biol Sex Differ*. 2015;6:24.

Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*. 2006;441:349-353.

Božović IB, Stanković A, Živković M, Vraneković J, Kapović M, Brajenović-Milić B. Altered LINE-1 Methylation in Mothers of Children with Down Syndrome. PLoS One. 2015 May 27;10(5):e0127423.

Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. Genes Dev. 2006;20(9):1123-36.

Bustin M, Trieschmann L, Postnikov YV. The HMG-14/-17 chromosomal protein family: architectural elements that enhance transcription from chromatin templates. Semin Cell Biol. 1995;6:247–255.

Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. Science. 2008;320:1224–1229.

Chango A, Abdennebi-Najar L, Tessier F, Ferre S, Do S, Guéant JL, et al. Quantitative methylation-sensitive arbitrarily primed PCR method to determine differential genomic DNA methylation in Down Syndrome. Biochem Biophys Res Commun. 2006;349:492–496.

Choi S. & Friso S. Epigenetics: A New Bridge between Nutrition and Health. Adv Nutr. 2010;(11):8-16.

Cicero S, Curcio P, Papageorgiou A, Sonek J, Nicolaides K. Absence of nasal bone in fetuses with trisomy 21 at 11–14 weeks of gestation: An observational study. Lancet. 2001;358:1665–1667.

Coppedè F. The complex relationship between folate/homocysteine metabolism and risk of Down syndrome. Mutat Res. 2009;(682):54-70.

Coppedè F. The genetics of folate metabolism and maternal risk of birth of a child with Down syndrome and associated congenital heart defects. Front Genet. 2015;6:223.

Coppedè F. Risk factors for Down syndrome. Arch Toxicol. 2016;90(12):2917-2929.

Dey SK & Ghosh S. (2011). Etiology of Down Syndrome: Risk of Advanced Maternal Age and Altered Meiotic Recombination for Chromosome 21 Nondisjunction. Prof. Subrata Dey (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/18333. Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetics-and-etiology-of-down-syndrome/etiology-of-down-syndrome-risk-of-advanced-maternal-age-and-altered-meiotic-recombination-for-chromo>

Ding HF, Rimsky S, Batson SC, Bustin M, Hansen U. Stimulation of RNA polymerase II elongation by chromosomal protein HMG-14. *Science*. 1994;265(5173):796-9.

Dupont J, Reverchon M, Bertoldo MJ, Froment P. Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):527–537.

Eichenlaub-Ritter U, Pacchierotti F. Bisphenol A Effects on Mammalian Oogenesis and Epigenetic Integrity of Oocytes: A Case Study Exploring Risks of Endocrine Disrupting Chemicals. *Biomed Res Int*. 2015;2015:698795.

El Hajj N, Dittrich M, Böck J, Kraus TF, Nanda I, Müller T, et al. Epigenetic dysregulation in the developing Down syndrome cortex. *Epigenetics*. 2016;11(8):563-78.

Ferrando-Miguel R, Cheon MS, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain (Part V): Overexpression of phosphatidylinositol-glycan class P protein (DSCR5). *Amino Acids*. 2004;26(3):255-61.

Freeman S. B, Yang Q, Allran K, Taft LF, Sherman SL. Women with a reduced ovarian complement may have an increased risk for a child with Down syndrome. *Am J Hum Genet*. 2000;66:1680-1683.

Friso S, Lamon-Fava S, Jang H, Schaefer EJ, Corrocher R, Choi SW. Oestrogen replacement therapy reduces total plasma homocysteine and enhances genomic DNA methylation in postmenopausal women. *British Journal of Nutrition*. 2007;97:617–621.

Furuse T, Miyake K, Kohda T, Kaneda H, Hirasawa T, Yamada I, et al. Protein-restricted diet during pregnancy after insemination alters behavioral phenotypes of the progeny. *Genes Nutr*. 2017;12:1.

Ganesh L, Yoshimoto T, Moorthy NC, Akahata W, Boehm M, Nabel EG, et al. Protein Methyltransferase 2 Inhibits NF- $\kappa$ B Function and Promotes Apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2006;26(10):3864-74.

Ge ZJ, Liang QX, Luo SM, Wei YC, Han ZM, Schatten H, et al. Diabetic uterus environment may play a key role in alterations of DNA methylation of several imprinted genes at mid-gestation in mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2013a;11:119.

Ge ZJ, Liang XW, Guo L, Liang QX, Luo SM, Wang YP, et al. Maternal diabetes causes alterations of DNA methylation statuses of some imprinted genes in murine oocytes. *Biology of Reproduction*. 2013b;88:117.

Ge ZJ, Schatten H, Zhang CL, Sun QY. Oocyte ageing and epigenetics. *Reproduction*. 2015;149(3):R103-14.

Ghosh S, Feingold E, Dey S. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction and maternal age across populations. *Am J Med Genet.* 2009;149A:1415-1420.

Ghosh S, Bhaumik P, Ghosh P, Dey S. Chromosome 21 nondisjunction and Down syndrome birth in Indian cohort: analysis of incidence and etiology from family linkage data. *Genet Res Cambridge.* 2010;92:189-197.

Gondos B, Westergaard L, Byskov AG. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1986;155:189-195.

Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev.* 2015;36(6):E1-E150.

Gray PA. 2013. Transcription factors define the neuroanatomical organization of the medullary reticular formation”, *Frontiers in Neuroanatomy*, Vol. 7, pp. 1–21.

Graybiel AM. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15:638-644.

Gu L, Liu H, Gu X, Boots C, Moley KH, Wang Q. Metabolic control of oocyte development: linking maternal nutrition and reproductive outcomes. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(2):251-71.

Hansen JC, Ghosh RP, Woodcock CL. Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life.* 2010;62:732–738.

Hassold T, Hall H, Hunt P. The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet.* 2007;2:203-208.

Hervouet E, Cartron PF, Jouvenot M, Delage-Mourroux R. Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics.* 2013;8(3):237-45.

Hill DA, Peterson CL, Imbalzano AN. Effects of HMGN1 on Chromatin Structure and SWI/SNF-mediated Chromatin Remodeling. *J Biol Chem.* 2005;280(50):41777-83.

Homer H. New Insights into the Genetic Regulation of Homologue Disjunction in Mammalian Oocytes. *Cytogenet Genome Res.* 2011;133(2-4):209-22.

Horvath S, Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C, Salvioli S, Gentilini D, et al. Accelerated epigenetic aging in Down syndrome. *Aging Cell.* 2015;14:491-5.

Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, Hata K, Li CL, Jin Y, et al. Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet.* 2008;17:2654–2664.

Iwasaki H, Kovacic JC, Olive M, Beers JK, Yoshimoto T, Crook MF, et al. Disruption of Protein Arginine N-Methyltransferase 2 regulates leptin signaling and produces leanness in vivo through loss of STAT3 methylation. *Circ Res.* 2010;107(8):992-1001.

Jacob RA, Gretz DM, Taylor PC, James SJ, Pogribny IP, Miller BJ, et al. Moderate folate depletion increases plasma homocysteine and decreases lymphocyte DNA methylation in postmenopausal women. *Journal of Nutrition.* 1998;128:1204–1212.

James SJ, Pogribna M, Pogribny IP, Melnyk S, Hine RJ, Gibson JB, et al. Abnormal folate metabolism and mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene may be maternal risk factors for Down syndrome. *Am. J Clin Nutr.* 1999;(70):495–501.

Jin S, Lee YK, Lim YC, Zheng Z, Lin XM, Ng DP, et al. Global DNA hypermethylation in down syndrome placenta. *PLoS Genet.* 2013;9(6):e1003515.

Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham-Kaplan O, et al. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod.* 2008;23(5):1138-44.

Jones MJ, Farre P, McEwen LM, Macisaac JL, Watt K, Neumann, SM, et al. Distinct DNA methylation patterns of cognitive impairment and trisomy 21 in Down syndrome. *BMC Med Gen.* 2013;(6):58.

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 1998;19:187–191.

Kazemi M, Salehi M, Kheirollahi M. Down Syndrome: Current Status, Challenges and Future Perspectives. *Int J Mol Cell Med.* 2016;5(3):125-133.

Kerkel K, Schupf N, Hatta K, Pang D, Salas M, Kratz A. et al. Altered DNA methylation in leukocytes with trisomy 21. *PLoS Genet.* (Research Support, N.I.H., Extramural). 2010;6(11):e1001212.

Kim J, Singh AK, Takata Y, Lin K, Shen J, Lu Y, et al. LSD1 is essential for oocyte meiotic progression by regulating CDC25B expression in mice. *Nat Commun.* 2015;6:10116.

Korbolina EE, Ershov NI, Bryzgalov LO, Kolosova NG. Application of quantitative trait locus mapping and transcriptomics to studies of the senescence-accelerated phenotype in rats. *BMC Genomics*. 2014;15 Suppl 12:S3.

Korzus E. Manipulating the brain with epigenetics. *Nat Neurosci*. 2010;(13):405-406.

Kota SK, Feil R. Epigenetic Transitions in Germ Cell Development and Meiosis. *Dev Cell*. 2010;19(5):675-86.

Kozioł LF, Budding D, Andreasen N, D'Arrigo S, Bulgheroni S, Imamizu H, et al. Consensus paper: the cerebellum's role in movement and cognition. *Cerebellum*. 2014;13(1):151-77.

Kuliev A, Zlatopolsky Z, Kirillova I, Spivakova J, Cieslak Janzen J. Meiosis errors in over 20,000 oocytes studied in the practice of preimplantation aneuploidy testing. *Reprod. Biomed*. 2011;22:2–8.

Lalioti MD, Scott HS, Antonarakis SE. Altered Spacing of Promoter Elements Due to the Dodecamer Repeat Expansion Contributes to Reduced Expression of the Cystatin B Gene in EPM1. *Hum Mol Genet*. 1999;8(9):1791-8.

Lamb NE, Feingold E, Savage A, Avramopoulos D, Freeman S, Gu Y, et al. Characterization of susceptible chiasma configurations that increase the risk for maternal nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Mol. Genet*. 1997;6:1391–1399.

Lane AA, Chapuy B, Lin CY, Tivey T, Li H, Townsend EC, et al. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 lysine 27 trimethylation. *Nat Genet*. 2014;46(6):618-23.

Letourneau A, Santoni FA, Bonilla X, Sailani MR, Gonzalez D, Kind J, et al. Domains of genome-wide gene expression dysregulation in Down's syndrome. *Nature*. 2014;508(7496):345-50.

Lincoln CM, Bello JA. and Lui YW. Decoding the Deep Gray: A Review of the Anatomy, Function, and Imaging Patterns Affecting the Basal Ganglia. *Neurographics*. 2012;2:92–102.

Lim JH, Catez F, Birger Y, West KL, Prymakowska-Bosak M, Postnikov YV, et al. Chromosomal protein HMGN1 modulates histone H3 phosphorylation. *Mol. Cell*. 2004;15:573–584.

Longo R, Ferrari A, Zocchi M, Crestani M. Of mice and humans through the looking glass: "Reflections" on epigenetics of lipid metabolism. *Mol Aspects Med*. 2017;S0098-2997(16):30114-5.

Lu J, Sheen V. Genetic and Epigenetic Mechanisms in Down Syndrome Brain in Down syndrome. Eds. Dey S., Publisher Intech Open Access, ISBN 978-953-51-1036-1. 237-261. 2013.

Lu J, Mccarter M, Lian G, Esposito G, Capoccia E, Delli-Bovi LC, et al. Global hypermethylation in fetal cortex of Down syndrome due to DNMT3L overexpression. Hum Mol Gen. 2016;1–20.

Manto M, Bower J, Bastos A, Delgado-García J, Farias da Guarda S, Gerwig M, et al. Consensus Paper: Roles of the Cerebellum in Motor Control - The Diversity of Ideas on Cerebellar Involvement in Movement. Cerebellum. 2012;11(2): 457–487.

Medina MR, Martínez C, Gutiérrez JA. Geografía de la mortalidad infantil en Colombia, 1995-1994. Bogotá: Imprenta DANE. 1999.

Mendioroz M, Do C, Jiang X, Liu C, Darbary HK, Lang CF, et al. Trans effects of chromosome aneuploidies on DNA methylation patterns in human Down syndrome and mouse models. Geno Bio. 2015;(16):263. DOI: 10.1186/s13059-015-0827-6.

Mentis AF. Epigenomic engineering for Down syndrome. Neurosci Biobehav Rev. 2016;71:323-327.

Meyer R, Wolf SS, Obendorf M. PRMT2, a member of the protein arginine methyltransferase family, is a coactivator of the androgen receptor. J Steroid Biochem Mol Biol. 2007;107(1-2):1-14.

Micheli F, Scorticati MC. and Zevallos E. Cirugía en la Enfermedad de Parkinson. Revista de Neuro-psiquiatría. 1998;61:58–67.

Mills JL, Carter TC, Kay DM, Browne ML, Brody LC, Liu A, Romitti PA, et al. Folate and vitamin B12-related genes and risk for omphalocele. Hum Genet. 2012;131(5):739-46.

Montoya JC, Soto J, Satizábal JM, Sánchez A, García-Vallejo F. Genomic study of the critical region of chromosome 21 associated to Down syndrome. Colombia Médica 2011;(42):26-38.

Nagarajan RP, Hogart AR, Gwye Y, Martin MR., LaSalle JM. Reduced MeCP2 expression is frequent in autism frontal cortex and correlates with aberrant MECP2 promoter methylation. Epigenetics. 2006;1:e1–11.

Obermann-Borst SA, van Driel LM, Helbing WA, de Jonge R, Wildhagen MF, Steegers EA, et al. Congenital heart defects and biomarkers of methylation in children: a case-control study. Eur J Clin Invest. 2011;41(2):143-50.



Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999;99: 247–257.

Okui M, Yamaki A, Takayanagi A, Kudoh J, Shimizu N, Shimizu Y. Transcription factor single-minded 2 (SIM2) is ubiquitinated by the RING-IBR-RING-type E3 ubiquitin ligases. *Exp Cell Res*. 2005;309(1):220-8.

Oliver TR, Tinker SW, Allen EG, Hollis N, Locke AE, Bean LJ, et al. Altered patterns of multiple recombinant events are associated with nondisjunction of chromosome 21. *Hum. Genet*. 2012;131:1039–1046.

Olmos-Serrano JL, Kang HJ, Tyler WA, Silbereis JC, Cheng F, Zhu Y. Down Syndrome Developmental Brain Transcriptome Reveals Defective Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Neuron*. 2016;89(6):1208-22.

Packard MG and Knowlton BJ. Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annu Rev Neurosci*. 2002;25:563-593.

Perluigi M, Di Domenico F, Buttfeld DA. Unraveling the complexity of neurodegeneration in brain of subjects with down syndrome: insights from proteomics. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(1-2):73-85.

Pindrik J, Bastian A. and Rigamonti D. 2014. Pathophysiology of gait dysfunction in normal pressure hydrocephalus, en Rigamonti, D. (Ed.), *Adult Hydrocephalus*, 1st ed., Cambridge University Press, New York, USA.

Postnikov YV, Belova GI, Lim JH, Bustin M. Chromosomal Protein HMGN1 Modulates the Phosphorylation of Serine 1 in Histone H2A. *Biochemistry*. 2006;45(50):15092-9.

Postnikov Y, Bustin M. Regulation of chromatin structure and function by HMGN proteins. *Biochim. Biophys*. 2010;1799:62–68.

Qi C, Chang J, Zhu Y, Yeldandi AV, Rao SM, Zhu YJ. Identification of Protein Arginine Methyltransferase 2 as a Coactivator for Estrogen Receptor  $\alpha$ . *J Biol Chem*. 2002;277(32):28624-30.

Quigley M, Cordes D, Turski P, Moritz C, Haughton V, Seth R, Meyerand ME. Role of the corpus callosum in functional connectivity. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003;24(2):208-12.

Ramocki MB, Tavyev YJ, Peters SU. The MECP2 duplication syndrome. *Am. J. Med. Genet A*. 2010;152A:1079–1088.

Rampersaud GC, Kauwell GP, Hutson AD, Cerda JJ, Bailey LB. Genomic DNA methylation decreases in response to moderate folate depletion in elderly women. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2000;72:998–1003.

Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J*. 1998;17:4905–4908.

Roberts R, Iatropoulou A, Ciantar D, Stark J, Becker DL, Franks S, et al. Follicle-stimulating hormone affects metaphase I chromosome alignment and increases aneuploidy in mouse oocytes matured in vitro. *Biol Reprod*. 2005;72:107-118.

Rochman M, Taher L, Kurahashi T, Cherukuri S, Uversky VN, Landsman D, et al. Effects of HMGN variants on the cellular transcription profile. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:4076–4087.

Sailani MR, Santoni FA, Letourneau A, Borel C, Makrythanasis P, Hibaoui Y, et al. DNA-Methylation Patterns in Trisomy 21 Using Cells from Monozygotic Twins. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135555.

Samaco RC, Fryer JD, Ren J, Fyffe S, Chao HT, Sun Y, et al. A partial loss of function allele of methyl-CpG-binding protein 2 predicts a human neurodevelopmental syndrome. *Hum. Mol. Genet*. 2008;17:1718–1727.

Sanchez-Mut JV, Heyn H, Vidal E, Delgado-Morales R, Moran S, Sayols S, *et al*. Whole Genome Grey and White matter DNA Methylation Profiles in Dorsolateral Prefrontal cortex. *Synapse*. 2017; [Epub ahead of print]. doi: 10.1002/syn.21959

Santoro N, Randolph JF. Reproductive Hormones and the Menopause Transition. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2011;38(3):455-66.

Sato A, Otsu E, Negishi H, Utsunomiya T, Arima T. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Human Reproduction*. 2007;22:26–35.

Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*. 2010;151:4871–4881.

Shipp T, Benacerraf B. Second trimester ultrasound screening for chromosomal abnormalities. *Prenat. Diagn*. 2002;22:296–307.

Sillence KA, Madgett TE, Roberts LA, Overton TG, Avent ND. Non-Invasive Screening Tools for Down's Syndrome: A Review. *Diagnostics (Basel)*. 2013;3(2):291-314.

Silva-Zolezzi I, Samuel TM, Spieldenner J. Maternal nutrition: opportunities in the prevention of gestational diabetes. *Nutr Rev.* 2017;75(suppl 1):32-50.

Sinclair KD, Watkins AJ. Parental diet, pregnancy outcomes and offspring health: metabolic determinants in developing oocytes and embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2013;26(1):99–114.

Singh-Taylor A, Molet J, Jiang S, Korosi A, Bolton JL, Noam Y, *et al.* NRSF-dependent epigenetic mechanisms contribute to programming of stress-sensitive neurons by neonatal experience, promoting resilience. *Mol Psychiatry.* 2017; [Epub ahead of print]. doi:10.1038/mp.2016.240.

Skene PJ, Illingworth RS, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, *et al.* Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell.* 2010;37:457–468.

Steegers-Theunissen RP, Twigt J, Pestinger V, Sinclair KD. The periconceptional period, reproduction and long-term health of offspring: the importance of one-carbon metabolism. *Human Reproduction Update.* 2013;19:640–655.

Tremethick DJ, Hyman L. High Mobility Group Proteins 14 and 17 Can Prevent the Close Packing of Nucleosomes by Increasing the Strength of Protein Contacts in the Linker DNA. *J Biol Chem.* 1996;271(20):12009-16.

Ueda T, Postnikov YV, Bustin M. Distinct domains in high mobility group N variants modulate specific chromatin modifications. *J. Biol. Chem.* 2006;281:10182–10187.

Vega-Pons S, Olivetti E, Avesani P, Dodero L, Gozzi A, Bifone A. Differential Effects of Brain Disorders on Structural and Functional Connectivity. *Front Neurosci.* 2017;10:605.

Villanueva R. The cerebellum and neuropsychiatric disorders. *Psychiatry Res.* 2012;198(3):527-32.

Walsh SW, Williams EJ, Evans AC. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011;123(3–4):127–138.

Wang M, Xie H, Shrestha S, Sredni S, Morgan GA, Pachman LM. Methylation Alterations of WT1 and Homeobox Genes in Inflamed Muscle Biopsies from Untreated Juvenile Dermatomyositis Suggests Self-renewal Capacity. *Arthritis Rheum.* 2012;64(10):3478-85.

Warburton D. Biological aging and the etiology of aneuploidy. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111:266-272.



Weinhaeusel A, Morris MA, Antonarakis SE, Haas OA. DNA deamination enables direct PCR amplification of the cystatin B (CSTB) gene-associated dodecamer repeat expansion in myoclonus epilepsy type. *Hum Mutat.* 2003;22(5):404-8.

Wilcock DM, Griffin WS. Down's syndrome, neuroinflammation, and Alzheimer neuropathogenesis. *J Neuroinflammation.* 2013;10:84.

Won SB, Han A, Kwon YH. Maternal consumption of low-isoflavone soy protein isolate alters hepatic gene expression and liver development in rat offspring. *J Nutr Biochem.* 2017;42:51-61.

Yasui DH, Peddada S, Bieda MC, Vallerio RO, Hogart A, Nagarajan RP, et al. Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007;104:19416–19421.

Yue MX, Fu XW, Zhou GB, Hou YP, Du M, Wang L, et al. Abnormal DNA methylation in oocytes could be associated with a decrease in reproductive potential in old mice. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2012;29:643–650.

Anexo 1. Nombres y símbolos de las diferentes estructuras del cerebro humano en donde se registraron los valores de expresión (z-score). Las siglas de las subestructuras que presentan mayor expresión se encuentran resaltadas en matices de rojo.

ESTRUCTURAS CEREBRALES						
Sustancia	Áreas encefálicas	Estructuras		Subestructuras	Siglas	
Gray Matter	Telencephalon	Cerebral Cortex	Frontal Lobe	Anterior Orbital Gyrus	AOrG	
				Frontal Operculum	fro	
				Gyrus Rectus	Gre	
				Inferior Frontal Gyrus, Opercular Part	opIFG	
				inferior frontal gyrus, orbital part	orIFG	
				inferior frontal gyrus, triangular part	trIFG	
				inferior rostral gyrus	IRoG	
				lateral orbital gyrus	LOrG	
				medial orbital gyrus	MOrG	
				middle frontal gyrus	MFG	
				paracentral lobule, anterior part	PCLa	
				parolfactory gyri	PaOG	
				posterior orbital gyrus	POrG	
				precentral gyrus	PrG	
				superior frontal gyrus	SFG	
				superior rostral gyrus	SROG	
				Insula	long insular gyri	LIG
					short insular gyri	SIG
			Limbic Lobe	cingulate gyrus, frontal part, superior	CgGf-s	
				cingulate gyrus, frontal part, inferior	CgGf-i	
				cingulate gyrus, parietal part, superior	CgGp-s	
				cingulate gyrus, parietal part, inferior	CgGp-i	
				cingulate gyrus, retrosplenial part	CgGr	
				subcallosal cingulate gyrus	SCG	
				dentate gyrus	DG	
				CA1 field	CA1	

				CA2 field	CA2
				CA3 field	CA3
				CA4 field	CA4
				subiculum	S
				parahippocampal gyrus	PHG
			Occipital lobe	Cuneus, peristriate	Cun-pest
				Cuneus, striate	Cun-str
				inferior occipital gyrus	IOG
				lingual gyrus, peristriate	LiG-pest
				lingual gyrus, striate	LiG-str
				occipito-temporal gyrus	OTG
				superior occipital gyrus	SOG
			Parietal lobe	angular gyrus	AnG
				supramarginal gyrus	SMG
				postcentral gyrus	PoG
				precuneus	Pcu
				superior parietal lobule	SPL
			Temporal lobe	fusiform gyrus	FuG
				Heschl's gyrus	HG
				inferior temporal gyrus	ITG
				middle temporal gyrus	MTG
				planum polare	PLP
				planum temporale	PLT
				superior temporal gyrus	STG
				temporal pole	TP
				transverse gyri	TG
		Cerebral Nuclei	Amygdala	basolateral nucleus	BLA
				basomedial nucleus	BMA
				central nucleus	CeA
				lateral nucleus	LA
			Basal Forebrain	septal nuclei	SptN
				substantia innominata	SI

			Basal Ganglia	globus pallidus, external segment	Gpe
				globus pallidus, internal segment	Gpi
			Striatum	caudate nucleus	Cd
				nucleus accumbens	Acb
				putamen	Pu
				claustrum	Cl
	Diencephalon	Epithalamus		epithalamus	Et
		Hypothalamus	Anterior Hypothalamic Region	lateral hypothalamic area, anterior region	LHA
				paraventricular nucleus of the hypothalamus	PVH
				supraoptic nucleus	SO
			Mammillary Region	lateral hypothalamic area, mammillary region	LHM
				mammillary body	MB
				tuberomammillary nucleus	TM
				preoptic region	PrOR
			Tuberal Region	dorsomedial hypothalamic nucleus	DMH
				lateral hypothalamic area, tuberal region	LHT
				ventromedial hypothalamic nucleus	VMH
				Subthalamus	SbT
		Thalamus	Dorsal Thalamus	anterior group of nuclei	DTA
				dorsal lateral geniculate nucleus	LGd
				lateral group of nuclei, dorsal division	DTLd
				lateral group of nuclei, ventral division	DTLv

				medial geniculate complex	MG
				medial group of nuclei	DTM
				posterior group of nuclei	DTP
				reticular nucleus of thalamus	R
	Mesencephalon	Midbrain Tectum		inferior colliculus	IC
				superior colliculus	SC
		Midbrain Tegmentum		midbrain raphe nuclei	MBRa
				midbrain reticular formation	MBRF
				oculomotor nuclear complex	3
				red nucleus	RN
				substantia nigra, pars compacta	SNC
				substantia nigra, pars reticulata	SNR
	Metencephalon	Cerebellum		cerebellar cortex	CbCx
				cerebellar nuclei	CbN
		Pons	Basal Pons	pontine nuclei	Pn
			Pontine Tegmentum	abducens nucleus	6
				facial motor nucleus	7
				locus ceruleus	LC
				pontine raphe nucleus	RPn
				paramedian pontine reticular formation	PPRF
				trigeminal nuclei	5
	Myelencephalon			dorsal motor nucleus of the vagus	10
				hypoglossal nucleus	12
				inferior olivary complex	IO
				medullary reticular formation	MeRF
				raphe nuclei of medulla	RaM
				spinal trigeminal nucleus	Sp5
				vestibular nuclei	8Ve





White Matter	Telencephalic White Matter	corpus callosum	cc
-----------------	-------------------------------	-----------------	----

Anexo 2. Lista de los 10 genes DSCR escogidos para evaluar la metilación de su región promotora en madres sanas y sus hijos con síndrome de Down.

<b>Código NCBI</b>	<b>Símbolo</b>	<b>Nombre</b>	<b>Locus</b>	<b>Proceso molecular*</b>	<b>Componente celular**</b>
1827	RCAN1	Regulador de Calcineurina 1	21q22.1-q22.2	Transcripción dependiente de ADN	Núcleo
10311	DSCR3	Gen 3 de la región crítica del Síndrome de Down	21q22.2	Transporte vacuolar	Retículo Endoplasmático
51227	PIGP	Anclaje de fosfatidilglicano de clase P	21q22.2	Pre-ensamblaje de GPI en membranas de RE	Integral de membrana
25825	BACE2	Sitio beta de la enzima de escisión de APP - 2	21q22.3	Proteólisis de ectodominio de proteína de membrana	Aparato de Golgi
6493	SIM2	"Solo memoria" - factor de transcripción 2 de la familia bHLH	21q22.2 - 21q22.13	Diferenciación celular	Núcleo
54014	BRWD1	Bromodominio y dominio WD repetido 1	21q22.2	Regulación de la transcripción dependiente de ADN	Citoplasma
3150	HMG1	Grupo de alta Movilidad de Unión 1 a Nucleosoma	21q22.3 - 21q22.2	Regulación positiva de la elongación de la transcripción, dependiente de ADN	Cromatina
1826	DSCAM	Molécula de adhesión celular del síndrome de Down	21q22.2	Adhesión celular	Integral de membrana plasmática
1476	CSTB	Cistatina B	21q22.3	Comportamiento locomotor adulto	Citoplasma
3275	PRMT2	Proteína arginina metiltransferasa 2	21q22.3	Crecimiento de las células en desarrollo	Citoplasma

(\*) Tomado de la página del correspondiente gen de la base de datos "Genes" Proceso Molecular, del "National Institute for Biotechnology Information" (NCBI).

(\*\*) Tomado de la página del correspondiente gen de la base de datos "Genes" Componente, del "National Institute for Biotechnology Information" (NCBI).